



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**MARTA MARIA SILVA**

**PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS SOROTIPOS DE  
*Streptococcus agalactiae* ISOLADAS EM GESTANTES DO  
MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA CONQUISTA-BA**

Vitória da Conquista-BA

2021

**MARTA MARIA SILVA**

**PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS SOROTIPOS DE  
*Streptococcus agalactiae* ISOLADAS EM GESTANTES DO  
MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA CONQUISTA-BA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista-BA

2021

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

S586

Silva, Marta Maria

Prevalência e distribuição dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* isoladas em gestantes do Município de Vitória da Conquista - BA / Marta Maria Silva. – 2021  
100 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2021.

1. *Streptococcus agalactiae*. 2. Gestantes. 3. Virulência. I. Universidade Federal da Bahia. II. Oliveira, Márcio Vasconcelos. III. Título.

CDU: 579.86 (813.8)

**MARTA MARIA SILVA**

**PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS SOROTIPOS DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADAS EM GESTANTES DO MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA CONQUISTA-BA**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 28/05/2021.



---

Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira (Orientador)  
(Universidade Federal da Bahia)



---

Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo (Examinador)  
(Universidade Federal da Bahia)



---

Prof. Dr. Cláudio Lima Souza (Examinador)  
(Universidade Federal da Bahia)

A Deus pelo cuidado infinito; aos meus familiares pela dedicação, amor, compreensão e carinho em todas as etapas da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e a meus familiares, em especial aos meus pais (Osmar e Creuza) que estiveram comigo durante todo o percurso da minha vida, incentivando e apoiando minhas iniciativas: Sou eternamente grata a vocês.

Ao meu orientador, professor Márcio Vasconcelos Oliveira, pelo apoio e orientações que direcionaram e permitiram a realização deste trabalho, oferecendo-me os subsídios necessários para esta conquista. Obrigada pelas dicas, pela paciência e pela dedicação.

Agradeço imensamente aos professores Lucas Miranda Marques e Fabrício Freire de Melo por disponibilizarem os materiais e reagentes para a realização da pesquisa. Estendo o agradecimento também à professora Milena Soares dos Santos por intermediar a disponibilização das cepas de referência junto à professora Joice Neves Reis Pedreira.

À professora Caline Novais Teixeira Oliveira, aos professores Cláudio Lima Souza e Fabrício Freire de Melo e as colegas Érica Alcântara Silva e Maria Luísa Cordeiro Santos pela valiosa colaboração na produção do nosso artigo que integra o capítulo 1 deste trabalho.

À Fabrícia Almeida Fernandes Santana e Taís Andrade Viana pela realização da coleta e acondicionamento de amostras que foram utilizadas nesta vertente da pesquisa.

Às colegas Janeide, Cristiana, Carla e Valdiele pelo apoio nas atividades em laboratórios.

Agradecimento sincero e imenso a Lucas Santana pela colaboração em todas as etapas dos experimentos.

A todos os colegas de turma do mestrado, especialmente, Beatriz, Allyne, lasmin, Juliana e Caiene.

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde e ao Programa de Pós-graduação em Biociências.

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B, são bactérias em forma de cocos, dispostas predominantemente em cadeias, Gram positivas, catalase e oxidase negativas. Podem residir comensalmente nos tratores gastrointestinal e geniturinário de humanos, mas apresentam potencial de desencadear infecções graves. Em neonatos, é um dos motivos mais relevantes de morbidade e mortalidade. As manifestações da doença podem variar entre sepse, pneumonia e meningite. O polissacarídeo capsular representa o mais relevante fator de virulência e determina a classificação dos 10 sorotipos já descritos. Este trabalho configura um recorte de um estudo mais amplo, cujo objetivo foi determinar a prevalência dos sorotipos de 34 cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gestantes colonizadas no município de Vitória da Conquista – BA. Foram utilizadas as técnicas moleculares de sorotipagem, via PCR multiplex e eletroforese em gel. O sorotipo Ia foi o mais prevalente 44,11% (15/34), seguido pelos sorotipos Ib, 26,47% (9/34) e II, 8,82%, (3/34). O sorotipo IX foi o menos prevalente 2,94%, (1/34). Cepas não tipáveis representaram 17,64% (6/34). Este estudo apresentou os primeiros dados de distribuição e prevalência de sorotipos de SGB no município que fortalece os dados já encontrados da prevalência de colonização nas gestantes e o perfil de sensibilidade, auxiliando de modo significativo os gestores locais na tomada de decisões para implementação de ações que minorem a transmissão vertical deste microrganismo, corroborando ainda para diminuição de impactos na saúde e na economia do município.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, virulência, sorotipo, PCR.

## **ABSTRACT**

*Streptococcus agalactiae* or group B streptococci (GBS), are Gram positive, catalase and oxidase negative bacteria in the form of cocci, arranged predominantly in chains. They reside commensally in the gastrointestinal and genitourinary tracts of humans, with the potential to trigger serious infections. In neonates, it is one of the most relevant causes of morbidity and mortality. The manifestations of the disease can vary between sepsis, pneumonia and meningitis. The capsular polysaccharide represents the most relevant virulence factor and determines the classification of the 10 serotypes already described. The present paper is an excerpt of a larger study, with the objective of disclosing the prevalence of serotypes of 34 strains of *Streptococcus agalactiae* isolated from colonized pregnant women in the county of Vitória da Conquista - BA. Molecular serotyping techniques were used, via multiplex PCR and gel electrophoresis. Serotype Ia was the most prevalent 44.11% (15/34), followed by serotypes Ib, 26.47% (9/34) and II, 8.82%, (3/34). Serotype IX was the least prevalent 2.94%, (1/34). Non-typable strains represented 17.64% (6/34) of the sample. This study presented the first data on the distribution and prevalence of GBS serotypes in the county, which strengthens the data already found on the prevalence of colonization in pregnant women and their sensitivity profile. These results also significantly assist local managers in making decisions to implement actions that reduce the vertical transmission of this microorganism, further corroborating to the reduction of impacts on the health and economy of the county.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, virulence, serotype, PCR.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>133</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>177</b>
2.1. Considerações gerais sobre o <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	177
2.2. Virulência.....	188
2.3. Importância Clínica e Sorotipos.....	199
2.4. Estratégias de Prevenção .....	21
2.4.1. Profilaxia antimicrobiana intraparto.....	22
2.4.2. Vacina.....	22
2.5. Resistência aos antibióticos e Sorotipos de SGB.....	244
2.6. Técnicas utilizadas para identificação dos sorotipos .....	255
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>266</b>
3.1. Geral.....	266
3.2. Objetivos específicos .....	266
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>277</b>
4.1. Delineamento do Estudo e Amostras .....	277
4.2. Processamento das amostras .....	277
4.3. Determinação dos sorotipos de SGB .....	289
4.3.1. Extração de DNA.....	30
4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	30
4.3.3. Eletroforese em gel de agarose .....	3131
4.4. Resistência aos antibióticos e Sorotipos de SGB.....	322
<b>5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>333</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>343</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>399</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>655</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO 1.</b> Parecer consubstanciado do CEP .....	<b>911</b>
<b>ANEXO 2.</b> Bula CHROMagar™ ORIENTATION.....	<b>966</b>
<b>ANEXO 3.</b> Bula Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T) .....	<b>988</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Amostras de SGB incubadas no caldo Tood-Hewitt.....	28
<b>Figura 2</b> – Colônias de SGB em ágar cromogênico.....	28
<b>Figura 3</b> – Colônias de SGB e colônias sugestivas de <i>Enterococcus</i> ssp. em ágar cromogênico.....	29
<b>Figura 4</b> – Colônias de SGB em ágar chocolate.....	29
<b>Figura 5</b> – Colônias sugestivas de <i>Enterococcus</i> ssp. em ágar cromogênico.....	29
<b>Figura 6</b> – Visualização padrão da eletroforese em gel para os produtos da PRC multiplex.....	32

## MATERIAL SUPLEMENTAR

<b>Figura 1</b> – Amostras de SGB incubadas no caldo Tood-Hewitt.....	87
<b>Figura 2</b> – Colônias de SGB em ágar cromogênico.....	87
<b>Figura 3</b> – Colônias de SGB e colônias sugestivas de <i>Enterococcus</i> ssp. em ágar cromogênico.....	87
<b>Figura 4</b> – Colônias de SGB em ágar chocolate.....	87
<b>Figura 5</b> – Colônias sugestivas de <i>Enterococcus</i> ssp. em ágar cromogênico.....	87
<b>Figura 6</b> - Fluxograma de procedimentos.....	88
<b>Figura 7</b> - Eletroforese em gel de agarose 2% para os sorotipos de SGB.....	88
<b>Figura 8</b> - Prevalência de sorotipos de SGB e resistência aos antibióticos.....	89

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Proteínas associadas à virulência em SGB.....	18
<b>Quadro 2.</b> Prevalência e manifestações clínicas dos sorotipos em diversos países..	20
<b>Quadro 3.</b> Nome e sequência dos iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex.....	31
<b>Quadro 4.</b> Tamanho em pares de base (pb) e tipo dos produtos de amplificação por PCR esperados para cada sorotipo (Ia a IX).....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> Methodological characteristics of the studies.....	47
<b>Table 2.</b> Prevalence of GBS in the countries analyzed.....	50
<b>Tabela 1.</b> Resistência antimicrobiana entre os sorotipos de SGB.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SGB	<i>Streptococcus</i> do Grupo B
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CPS	Polissacarídeo capsular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
MLST	Tipagem de sequências multilocus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
mm	Milímetro
CAMP	Acrônimo dos nomes dos autores do teste Christie, Atkins e Munch-Petersen
SP	São Paulo
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i>
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
ST	Sequência tipo
IMS	Instituto Multidisciplinar em Saúde
MI	Micro litro
MI	Mililitro
UFBA	Universidade Federal da Bahia
PBS	Tampão fosfato-salino
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mM	Milimol
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
TAE	Tampão Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
NT	Não tipável
PR	Paraná
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

## 1. INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B (SGB), são bactérias em forma de cocos, Gram positivas, imóveis, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas. Compõem a microbiota humana, podendo residir comensalmente nos tratos gastrointestinal e geniturinário (KONEMAN et al., 2018). Apesar disso, apresenta potencial para desencadear infecções graves, podendo estar associado a uma ampla variação de infecções, o que a aloca dentro do rol de agentes infecciosos importantes para os humanos, sobretudo neonatos (FURFARO, CHANG; PAYNE, 2018; SIQUEIRA 2017).

Quando ocorre doença pelo SGB em neonatos, pode ser classificada em: início precoce, cuja manifestação acontece na primeira semana de vida e, início tardio, sendo manifestada após uma semana até três meses de vida (FURFARO, CHANG; PAYNE, 2018).

A aquisição de doenças de início precoce pode ocorrer no útero em virtude da aspiração do líquido amniótico contaminado ou durante o parto. As manifestações da doença podem variar entre sepse, pneumonia, meningite e artrite séptica. Nas doenças de início tardio prevalece a bacteremia vinculada à meningite (EDWARDS; BAKER 2018). Shabayek e Spellerberg (2018) complementam que em caso de sobrevivência à meningite, as crianças poderão apresentar sequelas neurológicas crônicas, incluindo convulsões, comprometimento cognitivo, perda auditiva e cegueira em até 50% dos casos.

A colonização materna por SGB, tem sido apontada como a causa mais associada à infecção neonatal e com risco primário para a transmissão perinatal, podendo avançar para quadro infeccioso grave, com estimativa de 10% para mortalidade e 30% a 50% para complicações neurológicas (SHUNMING LI et al., 2018; FEUERSCHUETTE, 2018).

Dessa forma, as infecções causadas por SGB constituem um problema de saúde pública (SIQUEIRA, 2017; SILVA et al, 2015). Ações preventivas contra infecção em neonatos tem sido implementadas desde 1990. As primeiras diretrizes publicadas pelo *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos, pautadas em duas estratégias: determinação dos fatores de risco e rastreamento de cultura de secreção vaginorretal em gestantes entre a entre 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup>

semanas. Revisões de 2002 e 2010, sugeriram screening universal no terceiro trimestre de gestação com o estabelecimento de padrões para coleta e transporte da amostra, indicação de antimicrobianos e profilaxia.

A adoção de medidas para identificação de mulheres com risco de transmissão e a implementação de antibioticoterapia profilática podem diminuir o risco de infecção em até 78% dos neonatos (SIQUEIRA 2017).

Frente a esta situação, estudos têm sido realizados sobre o SGB, abordando prevalência de colonização em gestantes, resistência aos macrolídeos e prevalência de sorotipos do microrganismo (ANDRADE et al, 2017; BOLUKAOTO et al, 2015; BOTELHO et al, 2018; DUTRA et al, 2014; GENOVESE et al, 2020; GIZACHEW et al, 2019; KUNZE et al, 2011).

Estudo executado em Portugal, com 212 gestantes, estabeleceu prevalência de colonização de 16% (TORRES, 2012). Na Coreia, estudo envolvendo 150 gestantes indicou prevalência de colonização de 17,3% (LEE et al, 2018). Em Camarões, a colonização foi de 14% em 100 mulheres grávidas (NKEMBE et al, 2018) e na Sérvia, 15% para 1233 gestantes analisadas (GAJIC et al., 2019).

No Brasil, a prevalência de colonização também foi registrada e as taxas variaram da seguinte forma: 26,2% no Rio de Janeiro (BOTELHO et al., 2018); 38,6% em Santa Catarina (FEUERSCHUETTE, 2018); 14,37% no Distrito Federal (SIQUEIRA, 2017) e 20% em Campinas (ANDRADE et al., 2017). No município de Vitória da Conquista, um estudo piloto identificou uma prevalência de 17,4% (OLIVEIRA et al., 2013) e o estudo principal confirmou os dados apontando prevalência de 18,1% (SANTANA et al., 2020).

No que concerne aos estudos brasileiros sobre resistência aos antibióticos, investigações realizadas no Rio de Janeiro demonstraram cepas de SGB resistentes ao cloranfenicol (5%), clindamicina (5%) e eritromicina 14% (BOTELHO, et al, 2018). Em Vitória da Conquista-BA, as cepas de SGB isoladas foram resistentes à clindamicina (18,8%) e eritromicina (25%) (SANTANA et al, 2020). Estudos em outros países como Coreia e Espanha evidenciaram resistência à eritromicina entre 19,1% a 20,7% e resistentes à clindamicina entre 17,6 % a 33,3%. Um aspecto relevante em um desses estudos é que a resistência a macrolídeos foi indicada como estando relacionada aos sorotipos III e V de SGB (LÓPEZ, et al, 2018; LEE et al, 2018).

Os sorotipos de SGB são determinados pelo polissacarídeo capsular (CPS) e consistem no mais relevante fator de virulência. Imperi e colaboradores (2010) pontuou dez variantes antigênicas já identificadas, caracterizando os sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX. Feuerschuetz (2018) ressalta que os sorotipos Ia, Ib, II, III e V são indicados como os mais infectantes. O sorotipo Ia é isolado com mais frequência em amostras de gestantes assintomáticas, o sorotipo III é o mais prevalente em doenças de neonatos, sobretudo meningite e sepse, sendo responsável por mais da metade das infecções neonatais induzidas pelo SGB e; o sorotipo V sobressai em quadros de infecções em adultos. (FEUERSCHUETTE, 2018; FIOLO, 2011; SCHAECHTER, 2002).

No Brasil, foi relatada maior prevalência dos sorotipos Ia, III e Ib, respectivamente (FEUERSCHUETTE, 2018; BOTELHO et al, 2018; SIQUEIRA, 2017; ANDRADE et al., 2017; SOARES et al., 2013; SIMÕES et al., 2007).

Os sorotipos de SGB podem ser determinados por método convencional como aglutinação pelo látex, ou através de métodos moleculares, como PCR multiplex, técnica mais sensível e específica (ANDRADE et al, 2017). Técnicas de sequenciamento para classificação de SGB também já foram descritas (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018).

A classificação dos sorotipos tem um vasto fim epidemiológico em face a sua patogenicidade. Nesse sentido, a compreensão dos diferentes sorotipos em uma população possibilita a implementação de medidas profiláticas e terapêuticas mais específicas e adequadas, além de auxiliar no desenvolvimento de vacinas. (BOTELHO et al., 2018; ANDRADE et al., 2017; KHATAMI et al., 2019).

Considerando este contexto, estudos demonstraram prevalência relevante de colonização materna pelo SGB no município de Vitória da Conquista-BA. Em 2013, um estudo piloto observou uma prevalência de colonização em gestantes de 17,4% por SGB o que indicou a necessidade do desenvolvimento de um estudo maior vislumbrando justificar a implementação de protocolos de rastreio de SGB no município (OLIVEIRA, et al, 2013). Em 2020, duas vertentes de investigação, vinculadas a um estudo maior intitulado "*Streptococcus agalactiae*: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA,

foram realizadas (OLIVEIRA et al, 2020, SANTANA et al., 2020). Na publicação mais recente, a prevalência de colonização em gestantes foi de 18,1% (OLIVEIRA et al., 2020).

A terceira vertente explorada nesse estudo consistiu em realizar a sorotipagem das cepas de SGB que foram isoladas das gestantes, incluídas no estudo supracitado, com a finalidade de caracterizar geneticamente os sorotipos com o escopo de garantir um conjunto completo de informações acerca da dinâmica do SGB no binômio mãe-filho em Vitória da Conquista, podendo proporcionar aos gestores locais subsídios concretos para nortear a tomada de decisões para implementação de ações que minorem a transmissão vertical deste microrganismo corroborando ainda para diminuição de impactos na saúde e na economia do município.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Considerações gerais sobre o *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B (SGB) podem crescer disposto em pares ou pequenas cadeias quando observados em amostras clínicas e cadeias mais longas quando observados em cultura. Apresenta melhor crescimento quando cultivados em atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Edwards e Baker (2018) indicam que, em ágar sangue de carneiro, as colônias possuem diâmetro entre com 3 a 4 mm e coloração branco-acinzentadas.

A classificação sorológica de algumas espécies de estreptococos, realizada por Rebecca Lancefield, estabeleceu um sistema de agrupamento considerando os antígenos de carboidratos e ácidos lipoteicoicos da parede celular, diferenciando-as em grupo A, B, C, D e E (KONEMAN et al., 2018; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). O SGB é o único membro do grupo Lancefield que apresenta o antígeno do grupo B em sua parede (KONEMAN et al., 2018). Além disso, podem ser classificados de acordo com o padrão hemolítico:  $\alpha$ -hemolíticos,  $\beta$ -hemolíticos e sem hemólise ( $\gamma$ -hemolíticos) (MURRAY et al., 2015).

Os primeiros isolados do SGB foram provenientes de leite bovino, no ano de 1887, e tiveram sua vinculação à mastite bovina. O registro de isolados em secreções vaginais em pacientes assintomáticas, data de 1930 e foi estabelecida sua ligação com sepse e pneumonia puerperal. Apenas em 1970, o SGB foi confirmado como patógeno em seres humanos (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015).

SGB apresenta a proteína denominada fator CAMP (descrita por Christie, Atkins e Munch-Petersen) que, na presença de *Staphylococcus aureus*, produz hemólise sinérgica ao ser cultivada em ágar sangue (EDWARDS; BAKER, 2018). Como resultado, é possível visualizar uma área de hemólise aumentada em forma de ponta de setas onde há conjunção das duas estrias de crescimento.

## 2.2. Virulência

As diversas manifestações clínicas geradas pelo SGB são mediadas pela adaptação a diferentes sítios do hospedeiros. Dessa forma, o SGB pode apresentar fatores de virulência que favorecem a colonização, adesão, invasão de barreiras epiteliais e resistência imunológica (OTAGUIRI *et al*, 2013). De acordo com Dutra e colaboradores (2014) a virulência é considerada complexa e multifatorial.

A maioria dos genes relacionados com a virulência são responsáveis por codificar proteínas que estão associadas com a interação hospedeiro/bactéria e também à patogenicidade do microrganismo. Algumas dessas proteínas e respectivas funções constam no quadro 1:

**Quadro 1.** Proteínas associadas à virulência em SBG.

<b>Proteína</b>	<b>Genes</b>	<b>Função</b>
C $\alpha$	<i>Bca</i>	Aderência das células epiteliais
C $\beta$	<i>Bac</i>	Invasão de células epiteliais e à resistência à depuração de fagócitos
Proteína de ligação à laminina (LMB)	<i>Imb</i>	Medeia a aderência do GBS à laminina humana, facilita a invasão do SBG no SNC de neonatos
HylB	<i>hylB</i>	Cliva as cadeias de hialuronato, facilitando a disseminação do GBS pelos tecidos do hospedeiro

Fontes: Oviedo et al., 2013; Nagao, 2015.

O SGB produz a enzima C5a peptidase que interfere na quimiotaxia dos neutrófilos, atrai células inflamatórias e está envolvida no processo de inflamação pulmonar, podendo também atuar como adesina e invasina bacteriana (MURRAY et al., 2015).

O fator CAMP pode ser considerado um fator de virulência em virtude da capacidade de se ligar as imunoglobulinas G e M, via fração Fc (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015).

A parede celular, uma das estruturas que compõem o SGB, é composta por peptidoglicano, carboidratos, ácido teicóico e proteínas. Associado à parede celular, existe um polissacarídeo capsular (CPS), com constituição variável. Os monossacarídeos galactose, glicose, *N*-acetilglicerina e o ácido siálico (*N*-

acetilneuramínico) são os seus principais integrantes. São as características antigênicas do polissacarídeo que fundamentam a classificação dos sorotipos do SGB (Ia, Ib, II-IX), servem de base para investigações de cunho epidemiológico, estudos relativos à patogenicidade e desenvolvimento de vacinas. Além disso, o polissacarídeo capsular é indicado como o mais relevante fator de virulência, impedindo a fagocitose e requerendo o desenvolvimento de anticorpos tipo específico, limitando a indução da resposta inflamatória e neutralizando a secreção de citocinas. (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015; MURRAY et al., 2015; NAGAO, 2015). Shabayek e Spellerberg (2018) enfatizam que o CPS tem papel crucial na evasão imunológica mediante o mimetismo com os epítomos de carboidrato do hospedeiro. Além disso, interfere nas vias de defesa dependentes do complemento, atenua a função fagocítica dos neutrófilos e facilita a internalização bacteriana e a sobrevivência intracelular dentro das células dendríticas.

Edwards e Baker (2018) apontam proteínas semelhantes a pili como um outro elemento de constituição da superfície celular que contribui para a virulência, auxiliando a aderência nas superfícies das mucosas e a invasão. Ressaltam que tal componente faz parte de todas as cepas provenientes de humanos. Shabayek e Spellerberg (2018) reiteram que essas estruturas acessórias, constituídas da proteína pilina, são decisivas para adesão do SGB e desempenham papel na colonização de células epiteliais, formação de biofilme, translocação e invasão.

Outro fator de virulência, que é destacado por Nagao (2015) é toxina que forma poros nas membranas celulares, chamada  $\beta$ -hemolisina. Essa toxina possui função citolítica, ocasionando a lise de eritrócitos, favorecendo a invasão, evitando a morte fagocitária e, é responsável pela zona identitária da  $\beta$ -hemólise, perceptível quando a bactéria cresce em meio composto por ágar sangue.

### **2.3. Importância Clínica e Sorotipos**

O SGB representa um dos principais grupos de cocos gram positivos de importância clínica (EDWARDS; BAKER 2018). Em adultos, podem ser responsáveis por infecções da pele, dos tecidos moles e do trato urinário, bacteremia, pneumonia, artrite e endocardite (NAGAO, 2015).

Em mulheres grávidas, as infecções variam desde infecção urinária até sepse e meningite. Além disso, ainda são registradas infecções pelo SGB em adultos e idosos (RAABE; SHANE, 2019; MURRAY et al., 2015; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Em neonatos, a aquisição de doenças precoces pode ocorrer no útero em virtude da aspiração do líquido amniótico contaminado ou durante o parto. As manifestações da doença podem variar entre sepse, pneumonia, meningite e artrite séptica. Nas doenças tardias prevalece a bacteremia vinculada à meningite, e cerca de 95% dessas infecções são causadas pelo sorotipo III do SGB (LIN et al., 2018; EDWARDS; BAKER, 2018).

Dentre as dez variantes antigênicas já identificadas (Ia, Ib, II – IX) os sorotipos Ia, Ib, II, III e V são indicados como os mais infectantes. O sorotipo Ia é o isolado com mais frequência em amostras de gestantes assintomáticas, o sorotipo III é o mais prevalente em doenças de neonato, sobretudo meningite e sepse, sendo responsável por mais da metade das infecções neonatais induzidas pelo SGB e; o sorotipo V sobressai em quadros de infecções em adultos (FEUERSCHUETTE, 2018; FIOLO, 2011; SCHAECHTER, 2002).

A distribuição e prevalência dos sorotipos varia conforme a localização geográfica, a origem clínica da cepa e o decorrer do tempo (ANDRADE et al, 2017; BOTELHO, 2018).

Furfaro e colaboradores (2018) compilaram estudos sobre prevalência e tendências gerais dos sorotipos em vários países, e os resultados estão elencados no quadro 2.

**Quadro 2.** Prevalência e manifestações clínicas dos sorotipos em diversos países.

<b>Sorotipos</b>	<b>Apresentações clínicas</b>	<b>Países</b>
<b>Ia</b>	Colonização e doença materna, doença neonatal, sepse	Estados Unidos, Reino Unido e França, Espanha
<b>Ib</b>	Doenças neonatais, colonização materna, colonização de adultos não grávidas, infecções em adultos	Leste da Ásia, Taiwan, México e América do Sul
<b>II</b>	Doença materna, infecções em adultos, doenças neonatais, colonização materna, colonização neonatal e sepse.	Estados Unidos, Reino Unido, França, Espanha, Nigéria

<b>III</b>	Doença neonatal, meningite infantil, infecções invasivas em adultos, colonização materna	África, Austrália Nova Zelândia, França, Quênia, Islândia
	*	Canadá, Estados Unidos e Quênia
<b>IV</b>		
<b>V</b>	Doença e colonização materna	Estados Unidos, Reino Unido, França
<b>VI</b>	Colonização materna	Japão e Malásia
<b>VII</b>	Colonização materna e colonização de neonatos	Gana, Índia e Bangladesh
<b>VIII</b>	Colonização materna, doença invasiva em adultos não grávidas	Japão, Dinamarca
<b>IX</b>	Doenças invasivas em adultos e neonatos, sepse tardia	Gana, Suécia

\* Não foram descritas manifestações clínicas.

Estudos brasileiros envolvendo a colonização de gestantes por SGB, realizados entre 2007 e 2018, demonstraram que os sorotipos Ia, Ib, II, III foram os mais prevalentes em Santa Catarina, Rio de Janeiro, Distrito Federal e São Paulo. Os sorotipos IV – VIII foram menos prevalentes (FEUERSCHUETTE, 2018; BOTELHO et al., 2018; SIQUEIRA, 2017; ANDRADE, 2017).

Ao analisarem a taxa de infecção e sorotipos de SGB, originários de amostras de neonatos em Campinas (SP), Fiolo e colaboradores (2011), identificaram os sorotipos Ia, III e V em amostras de líquidos biológicos (sangue e líquido). Além dos dados brasileiros, a prevalência de SGB em neonatos em outros países como Alemanha, Espanha e Coréia também foram verificadas. Nesses países, seguindo a ordem de maior prevalência, foram identificados os sorotipos III, Ia, V e Ib (KUNZE et al., 2011; LOPEZ et al., 2018; LIÉBANA-MARTOS, et al., 2014; YOON et al, 2015). Na Nigéria o sorotipo II foi o mais prevalente (ELIKWU et al., 2016).

#### **2.4. Estratégias de Prevenção**

A profilaxia antimicrobiana intraparto e vacinação são apontadas como estratégias para a prevenção de doenças pelo SGB (JOHANSEN et al, 2019). Moraleda e colaboradores (2018) ressaltam que para o desempenho eficaz dessas estratégias, é indispensável a existência de sistemas de saúde funcionais, que raramente estão disponíveis em países de média e baixa renda.

Em 2018, o CDC deixou de ser responsável pela administração e atualização das diretrizes de profilaxia contra SGB, transferindo para o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) e *American Academy of Pediatrics* (AAP). As atualizações mais recentes (2020) mantêm a triagem universal das gestantes no pré-natal, coleta e processamento correto do espécimes e implantação adequada de profilaxia antibiótica intraparto como medidas essenciais para a prevenção eficaz de doença de início precoce por SGB.

#### **2.4.1. Profilaxia antimicrobiana intraparto**

De acordo com Lawn e colaboradores (2017), em países de alta renda com boa captura de casos e vigilância laboratorial de rotina, o SGB tornou-se bem conhecido como causa de mortes infantis, principalmente na primeira semana de vida, despertando a necessidade de adoção de estratégias de profilaxia. Nos Estados Unidos, houve declínio na doença de início precoce após a implementação desta estratégia (de 0,37 para 0,23 por 1000 nascidos vivos), considerando o período de 2006 a 2015 (NANDURI et al, 2019).

Desde o início da implementação de ações que visaram minorar a ocorrência de doença neonatal por SGB, a penicilina tem assumido papel crucial. Até hoje, trata-se do antibiótico de primeira escolha para tratamento dessas infecções. A eritromicina, a clindamicina e vancomicina são as alternativas para pacientes alérgicos aos  $\beta$ -lactâmicos (MURRAY et al., 2015; LÓPEZ et al.; 2018).

Quanto à eficácia da profilaxia antimicrobiana intraparto, é dependente tanto da detecção oportuna de gestantes infectadas pelo SGB quanto do perfil de resistência aos antibióticos das cepas isoladas (GENOVESE et al., 2019). A aquisição de informações referentes à susceptibilidade favorece o tratamento e reduz o aparecimento de resistência (NKEMBE et al., 2018).

#### **2.4.2. Vacina**

A vacinação materna representa a alternativa mais promissora na prevenção da infecção pelo SGB. Protegendo os neonatos, evita doenças maternas e natimortos, constituindo a estratégia preventiva mais eficaz de longo prazo, sustentável,

econômica e que evitaria o uso de antibiótico. Uma vacina eficaz estimularia a produção de anticorpos funcionalmente ativos capazes de atravessar a placenta e fornecer a proteção neonatal (LIN et al, 2018; NUCCITELLI et al, 2015; MELIN, 2011). De acordo com Dzanibe e Madhi (2018) a imunidade adquirida por meio de anticorpos via placenta reduz o risco de doença de início precoce e tardio em neonatos.

Inicialmente, para o desenvolvimento da vacina foi estabelecido como alvo o polissacarídeo capsular, considerando a sua relevância na patogênese do SGB (LIN et al, 2018; MELIN, 2011). As diferenças químicas e antigênicas que definem os tipos capsulares estão envolvidos nos mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (MORALEDA et al, 2018). O grande desafio para sua criação é a conjugação das diferentes cepas (COSTA, 2011), havendo necessidade de considerar as variações regionais dos sorotipos que apresentam mudança na sua distribuição ao longo do tempo em diferentes partes do mundo (MELIN, 2011; FEUERSCHUETTE, 2018).

Estudo randomizado por Madhi e colaboradores (2016) analisou uma vacina experimental trivalente de SGB (sorotipos Ia, Ib e III) em mulheres saudáveis grávidas e não grávidas. Como principais resultados apresentaram que houve boa tolerância e indução de resposta de anticorpos específicos da cápsula. Além disso, a vacinação materna elevou a concentração de anticorpos específicos dos sorotipos nos neonatos.

Vekemans e colaboradores (2019) apresentaram estratégia de conjugação de polissacarídeo-proteína pelas farmacêuticas GlaxoSmithKline (GSK) e Pfizer no desenvolvimento da vacina SBG. As vacinas produzidas foram direcionadas aos principais sorotipos relacionados à doença neonatal e a vacina conjugada trivalente (Ia, Ib e III). Já apresentou segurança e imunogenicidade favoráveis em mulheres grávidas e não grávidas.

Buurman e colaboradores (2019) avaliaram uma vacina hexavalente composta pelos sorotipos de SGB mais prevalentes (Ia, Ib, II, III, IV e V), com cobertura potencial de 98% dos isolados causadores de doenças invasivas neonatais. Até o momento, o ensaio para esta vacina foi realizado em camundongos e macacos.

Kwatra e Madhi (2020) apontaram várias tentativas de desenvolvimento de vacinas desde as primeiras gerações das monovalentes até as conjugadas, mas apesar de todos os esforços já empregados, nenhuma vacina licenciada para SGB

está disponível no mercado (LIN et al, 2018). É importante ressaltar que o padrão ouro para o licenciamento de uma nova vacina é mediante ensaios randomizados controlados que demonstrem eficácia contra desfechos clínicos, tais como doença invasiva por SGB (KWATRA e MADHI, 2020).

## **2.5. Resistência aos antibióticos e Sorotipos de SGB**

De acordo com Gizachew e colaboradores (2019), o uso generalizado da profilaxia antimicrobiana intraparto como prevenção de doença de início precoce tem gerado preocupação com o surgimento de resistência a antibióticos entre os isolados de SGB. Esse microrganismo permanece susceptível à penicilina que é a base do tratamento para doenças invasivas (RAABE, 2019). Entretanto, a resistência aos antibióticos de segunda escolha já tem sido registrada, impactando na diminuição de alternativas profiláticas para pacientes alérgicas à penicilina (GENOVESE et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020; SANTANA et al., 2020; MELO et al., 2016; DUTRA et al., 2014).

Foram descritos dois mecanismos de resistência à eritromicina e clindamicina. O primeiro está relacionado à modificação ribossômica codificada pelos genes *erm* (*ermA* e *ermB*), responsável pelo fenótipo MLSB. O MLSB pode ser indutível (iMLSB) ou constitutivo (cMLSB). O segundo mecanismo é um bomba de efluxo mediada pelos genes *mef*, responsável pelo fenótipo M. (SHABAYEK et al., 2014; BOLUKAOTO et al., 2015).

Estudos brasileiros e internacionais documentaram resistência à clindamicina e/ou eritromicina em isolados dos sorotipos Ia, Ib, II, III, V, VIII e IX (SIQUEIRA, 2017; NASCIMENTO, 2019; ANDRADE et al., 2017; PINTO et al., 2017; YAN et al., 2016; LEE et al., 2019; KIMURA et al., 2013). Fröhlicher e colaboradores (2014) demonstraram que existe uma associação entre o sorotipo de SGB e a resistência à clindamicina e eritromicina.



## 2.6. Técnicas utilizadas para identificação dos sorotipos

Os sorotipos de SGB podem ser determinados por método convencional como a aglutinação pelo látex, ou através de métodos moleculares, como a PCR multiplex, técnica mais sensível e específica para caracterização dos sorotipos (ANDRADE et al., 2017). A sorotipagem de SGB é mais usualmente efetuada pela aglutinação de látex, por meio de kits comerciais confiáveis e de fácil manuseio. Entretanto, esse método apresenta limitações como a impossibilidade de identificar algumas cepas, em virtude da ausência ou baixa expressão do polissacarídeo capsular, e chance de reações cruzadas falso-positivas (KHATAMI et al., 2019).

Dentre as técnicas moleculares, Jones e colaboradores (2003) apontaram uma ferramenta baseada no sequenciamento de nucleotídeos, denominada tipagem de sequências multilocus (MLST) para classificação de SGB. Foi introduzido um esquema de tipagem de sequência multilocus de sete genes e os primeiros estudos demonstraram que o sorotipo capsular não estava vinculado exclusivamente a um tipo de sequência (ST) e evidenciaram que cepas com o mesmo tipo de sequência podiam apresentar sorotipos distintos. Os STs são agrupados em complexos clonais (CC) ao compartilhar seis ou sete alelos correspondentes. Com a disponibilidade de dados MLST foi possível verificar que cepas de SGB com certos CCs apresentam maior potencial para causar doenças, enquanto outros abrigam cepas colonizadoras.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar a prevalência e caracterização molecular dos sorotipos de SGB isolados de gestantes colonizadas atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Vitória da Conquista – BA.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ✓ Realizar a sorotipagem das cepas SGB isoladas pela técnica de PCR multiplex;
- ✓ Determinar a prevalência dos sorotipos;
- ✓ Apontar os sorotipos de SGB relacionados com fenótipo e genes de resistência aos antibióticos previamente identificados na primeira fase do estudo maior.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Delineamento do Estudo e Amostras

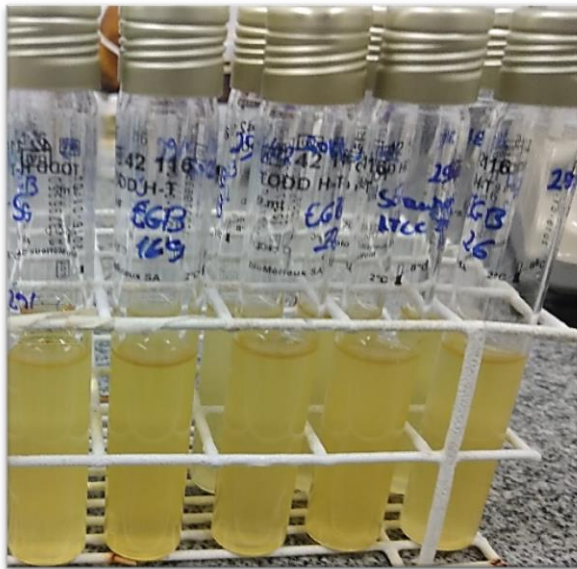
Trata-se de um estudo transversal com abordagem quantitativa. As amostras incluídas neste trabalho foram provenientes de uma pesquisa maior intitulada “*Streptococcus agalactiae*: Prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia, mediante o número de registro CAAE 58104116.8.0000.5556, sob parecer de número 1.736.058 (ANEXO 1) onde foram analisadas 210 amostras de secreção vaginal/retal de gestantes (32 a 40 semanas de gestação) atendidas em 9 Unidades Básicas de Saúde e houve isolamento de SGB em 18,1% (n=38). Com os dados obtidos na primeira fase do estudo, duas vertentes de investigações distintas foram realizadas de forma exitosa (OLIVEIRA et al., 2020; SANTANA et al; 2020). Todos os espécimes de SGB isolados na primeira fase foram aliquotados e congelados em suspensão em meio BHI glicerinado a 20% e depositadas no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS) da UFBA. Compondo a segunda fase do estudo e uma terceira vertente de investigação, na presente proposta, os espécimes de SGB foram encaminhados para caracterização molecular. Entre as amostras disponíveis, 3 foram inviabilizadas em virtude de contaminação por outros microrganismos e 1 por não apresentar crescimento em meio de cultivo. Ao final, 34 amostras foram analisadas e compõem o universo amostral deste estudo.

Para o desenvolvimento da proposta realizou-se Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex e eletroforese em gel de agarose.

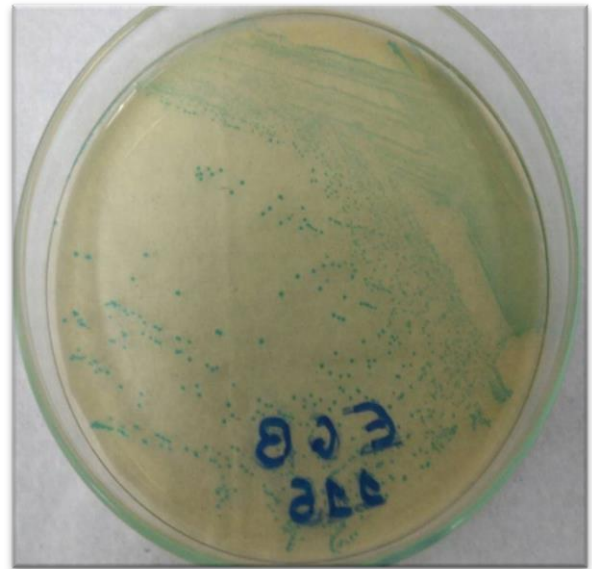
### 4.2. Processamento das amostras

As amostras foram descongelados à temperatura ambiente, homogeneizadas e em seguida um volume de 10 µl do conteúdo de cada eppendorf foi transferido para tubos de ensaio contendo 9 ml do meio seletivo Tood-Hewitt BIOMERIEUX® (figura 1), em seguida foram incubados por 24 horas em temperatura de 35-37°C. Após esta

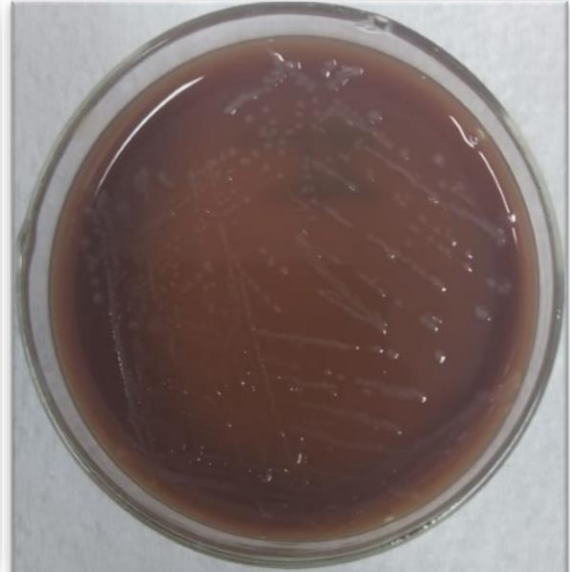
etapa, realizou-se repique para meio cromogênico *CHROMagar™ Orientation*, utilizando técnica de semeadura por esgotamento com alça de platina, sendo em seguida incubados por 24 horas em temperatura de 35-37°C. Após período de incubação, seguindo as orientações do fabricante (ANEXO 2), todas as colônias de cor azul claro foram certificadas como colônias de SGB (figura 2). Para as amostras que não cresceram puras em ágar cromogênico (figura 3) realizou-se repique das colônias azul claro em ágar chocolate e foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C por 24 horas (figura 5). Em seguida realizou-se a sorogrupagem para confirmação da espécie, utilizando o *Kit SLIDEX® Strepto Plus B* (BIOMERIEUX). Para as amostras cujo crescimento não apresentou nenhuma colônia sugestiva de SGB em meio cromogênico (figura 5) ainda assim, para as colônias azuis, independente das tonalidades, foram repicadas em ágar chocolate e incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C por 24 horas. Em seguida, realizou-se a sorogrupagem para inclusão ou exclusão da amostra. Uma vez realizada a etapa de crescimento em meio de cultivo, 34 amostras foram certificadas como SBG e encaminhadas para determinação de sorotipos.



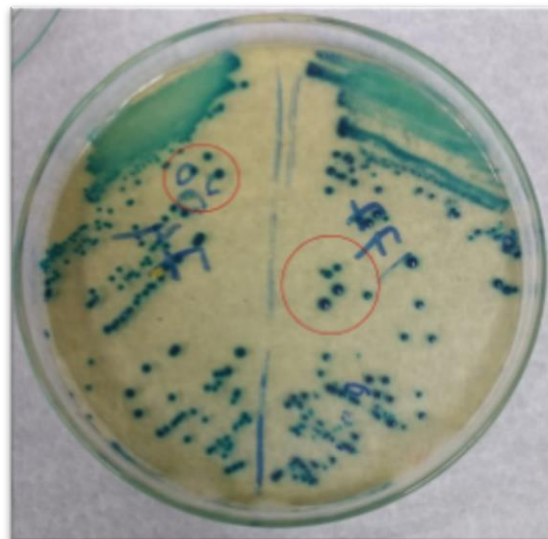
**Figura 1-** Amostras de SGB incubadas no caldo Todd-Hewitt.



**Figura 2-** Colônias de SGB em ágar cromogênico.



**Figura 3-** Colônias de SGB (azul claro) e colônias sugestivas de *Enterococcus* ssp. (azul turquesa) em ágar cromogênico. **Figura 4-** Colônias de SGB em ágar chocolate.



**Figura 5-** Colônias sugestivas de *Enterococcus* ssp. em ágar cromogênico.

#### 4.3. Determinação dos sorotipos de SGB

Os sorotipos de SGB foram determinados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, seguindo o protocolo de Imperi e colaboradores (2010). A presença dos sorotipos foi confirmada com amplificação de fragmentos de

DNA, correspondente a cada gene investigado. Para controle das reações, foram utilizadas cepas de referência de cada sorotipo.

#### **4.3.1. Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura (FAN et al., 1995). As amostras provenientes da cultura foram centrifugadas durante 15 minutos a 1400 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e em cada eppendorf contendo o *pellet* foram acrescentados 100µL de solução salina tamponada com fosfato – PBS- (água destilada, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1400 rpm. Essa etapa foi realizada duas vezes. Após a centrifugação, foi realizado mais um descarte do sobrenadante e o *pellet* foi suspenso com 50µL de PBS. A seguir, os eppendorfs foram vedados com parafilm e colocados no bloco seco a 100°C por 10 min. Após esse procedimento, os eppendorfs foram acondicionados em gelo por 5 minutos e colocados no freezer. Na etapa subsequente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1400 rpm. Concluída a centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para eppendorfs novos e o *pellet* foi descartado. Foi feita a análise da concentração e qualidade do DNA através do espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop*. As amostras de DNA extraídas foram armazenadas a -20°C até o momento da PCR.

#### **4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Após a extração do DNA, foi realizada a PCR multiplex, para identificar o sorotipo de SBG baseado no polissacarídeo capsular, mediante o uso de Primers específicos (quadro 3), sendo que um par destes foi utilizado para controle positivo interno, correspondendo a uma região conservada do gene *cpsL* (688pb) constituinte de todos os sorotipos.

A mistura da PCR, com o volume final de 25 µl continha: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 250 nM de cada primer direto e reverso, tampão de Taq polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,3 U de Taq DNA polimerase e 5 µl do DNA molde. Em seguida a reação foi levada ao termociclador e programado da seguinte forma: desnaturação por 5 minutos a 95° C, seguido de 15

ciclos de 95°C durante 60 segundos, 54°C durante 60 segundos e 72°C por 2 minutos e depois por 25 ciclos adicionais de 95°C por 60 segundos, 56° C por 60 segundos e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

**Quadro 3-** Nome e sequência dos iniciadores utilizados na reação de PCR Multiplex. (Imperi et al., 2010).

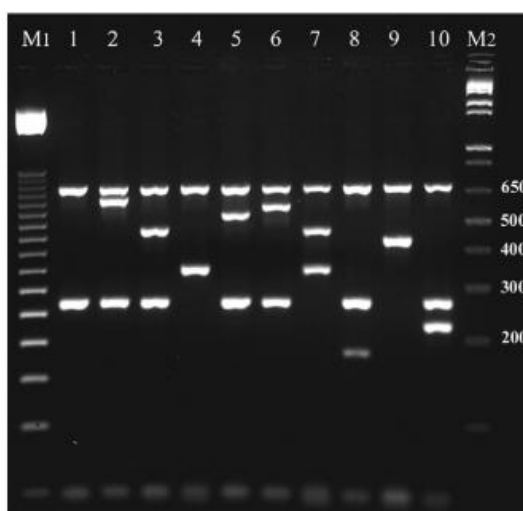
Nome do primer	Sequência 5' → 3'
<b>cpsI-la-6-7-F</b>	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA
<b>cpsI-6-R</b>	CAATTCTGTCTGGACTATCCTGATG
<b>cpsI-7-R</b>	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA
<b>cpsL-F</b>	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT
<b>cpsL-R</b>	TAGGAACATGTTCAATTAACATAGC
<b>cpsG-F</b>	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT
<b>CpsG-R</b>	ATGCTCTCCAAACTGTTCTTGT
<b>CpsG-2-3-6-R</b>	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC
<b>CpsN-5-F</b>	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA
<b>CpsN-5-R</b>	CTCTTCACTCTTTAGTGTAGGTAT
<b>CpsJ-8-F</b>	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA
<b>CpsJ-8-R</b>	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT
<b>cpsJ-2-4-F</b>	CATTTATTGATTCAGACGATTACATTGA
<b>cpsJ-2-R</b>	CCTCTTTCTCTAAAATATTCCAACC
<b>cpsJ-4-R</b>	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA
<b>cpsI-7-9-F</b>	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG
<b>cpsI-9-R</b>	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT
<b>cpsJ-lb-F</b>	GCAATTCTTAACAGAATATTCAGTTG
<b>cpsJ-lb-r</b>	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG

#### 4.3.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE (Tris, ácido acético e EDTA) 1X. O gel foi corado com brometo de etídeo e após corrida eletroforética foi visualizado no transiluminador UV (L-PIX, Loccus Biotecnologia). Cada sorotipo foi identificado pela análise do padrão de duas ou três bandas (quadro 4) observadas no gel (Figura 6). Foi utilizado marcador de peso molecular na escala de 100 bp Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific).

**Quadro 4-** Tamanho em pares de bases (pb) e tipo dos produtos de amplificação por PCR esperados para cada sorotipo (Ia a IX) (Imperi et al.; 2010).

Sorotipos	Genes	Produto (pb)	Sorotipos	Genes	Produto (pb)
<b>Ia</b>	cpsL	688	<b>V</b>	cpsL	688
	cpsG	272		cpsN	582
<b>Ib</b>	cpsL	688	<b>VI</b>	cpsL	688
	cpsJ	621		cpsI	470
	cpsG	272		cpsG	352
<b>II</b>	cpsL	688	<b>VII</b>	cpsL	688
	cpsJ	465		cpsG	272
	cpsG	272		cpsI	179
<b>III</b>	cpsL	688	<b>VIII</b>	cpsL	688
	cpsG	352		cpsJ	438
<b>IV</b>	cpsL	688	<b>IX</b>	cpsL	688
	cpsJ	538		cpsG	272
	cpsG	272		cpsI	229



**Figura 6** – Visualização padrão da eletroforese em gel para os produtos da PCR multiplex. Colunas 2-10 (Sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) (Imperi et al.; 2010).

#### 4.4. Resistência aos antibióticos e Sorotipos de SGB

Os fenótipos de resistência (cMLSB, iMLSB e Fenótipo M) para as cepas de SGB resistentes à eritromicina e/ou clindamicina e a determinação dos genes de resistência à eritromicina (*ermB*, *ermTR* e *mefA*) e clindamicina (*linB*) foram analisados por Santana e colaboradores (2020) na primeira fase do estudo maior e



esses dados foram utilizados no presente estudo para indicar a classificação dos sorotipos aos quais são pertencentes.

## **5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Face à natureza do estudo, foi realizada análise meramente descritiva das variáveis com o banco de dados constituído em *Microsoft Excel*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, P. D. et al. Molecular characterization of group B Streptococcus serotypes by multiplex polymerase chain reaction. **Medical Express**. v. 4. p. 1-6, 2017.
- BOLUKAOTO, J. Y. et al. Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 6–12, 2015.
- BOTELHO, A. C. N. et al. Streptococcus agalactiae carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. **PLoS ONE**. 13(5). p. 1-12, 2018.
- BUURMAN, E. T. et al. A Novel Hexavalent Capsular Polysaccharide Conjugate Vaccine (GBS6) for the Prevention of Neonatal Group B Streptococcal Infections by Maternal Immunization. **The Journal of Infectious Diseases**. Jun 5; 220(1). p.105-115, 2019.
- CDC. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **MMWR**, v. 59, n. No. RR-10, p. 1–32, 2010.
- COSTA, H. P. F. Prevenção da Doença Perinatal Pelo Estreptococo do Grupo B. SBP. São Paulo; p.1–18, 2011.
- DUTRA, V. G. et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: Serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- DZANIBE S; MADHI, S. A. Systematic review of the clinical development of group B streptococcus serotype-specific capsular polysaccharide-based vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v.17, n. 7, p. 635-651, 2018.
- EDWARDS, M. S; BAKER, C. J. Group B Streptococcal Infections. **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. 4ª Ed., 2018. p. 723-729, 2018.
- ELIKWU C, J, et al. High group B streptococcus carriage rates in pregnant women in a tertiary institution in Nigeria. **Pan Africa Medical Journal**. v.25, p. 1-9, 2016.
- IMPERI, M. et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae. **Journal of Microbiological Methods**. v. 80, p.212–214, 2010.
- FEUERSCHUETTE, O. H. M. – Diversidade genética e características fenotípicas do estreptococo do grupo B do trato anogenital de gestantes. Tese (Doutorado EM Ciências da Saúde) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
- FIOLO, K. Identificação dos sorotipos de Streptococcus agalactiae pela técnica de PCR de amostras isoladas em pacientes colonizados e infectados na cidade de Campinas e região – Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, 2011.

FRÖHLICHER, S, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: Results from a Swiss tertiary centre. **Swiss Medical Weekly**. v. 144: p. 1-6, 2014.

FURFARO, L; CHANG, B. J e PAYNE, M. S. Perinatal Streptococcus agalactiae edipemiology and surveillance targets. **Clinical Microbiology Reviews**. v.31, p. 1 - 18, 2018.

GAJIC, I; et al. Molecular epidemiology of invasive and non-invasive group B Streptococcus circulating in Serbia. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, p. 19-25, 2019.

GENOVESE, C. et al. Streptococcus agalactiae in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. n.39, v.12, p. 2387-2396, 2020.

GIZACHEW, M; et al. Streptococcus agalactiae maternal colonization, antibiotic resistance and serotype profiles in Africa: a meta-analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. n.18, v.14, 2019.

JOHANSEN, N, R; et al. Prevalence and treatment of group B streptococcus colonization based on risk factors versus intrapartum culture screening. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. n.240, p.178-181, 2019.

JONES, N; et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. **Journal of Clinical Microbiology**. 41, p. 2530–2536, 2003.

KHATAMI, A; et al. Vaginal co-colonization with multiple Group B Streptococcus serotypes. **Vaccine**. v.37, p. 409-411, 2019.

KONEMAN, E; et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KUNZE M, et al. Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany. **Journal of perinatal medicine**. n. 39, v. 4, p.; 417-422, 2011.

KWATRA, G; MADHI, S. A. Group B Streptococcus. Maternal prevention strategies against Group B Streptococcus infection. p. 235-252, 2020.

LAWN J. E. et al. Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children: Why, What, and How to Undertake Estimates? **Clinical Infectious Diseases**. n. 6, v. 65, 2017.

LEE, H. T; et al. Detection and genomic analysis of genital group B streptococcus in pregnant Korean women. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**. v. 45, p. 69–77, 2018.

LIÉBANA-MARTOS, M. D. C. et al. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic *Streptococcus agalactiae* isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 32, n. 2, p. 84-88, 2015.

LIN, S. M et al. Status of group B streptococcal vaccine development. **Clinical and Experimental Vaccine Research**. v. 7, n. 1, p. 76-81, 2018.

LÓPEZ, Y. et al. Serotype, virulence profile, antimicrobial resistance and macrolide-resistance determinants in *Streptococcus agalactiae* isolates in pregnant women and neonates in Catalonia, Spain. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 36, p. 472-477, 2018.

MADHI, S. A. et al. Safety and immunogenicity of an investigational maternal trivalent group B streptococcus vaccine in healthy women and their infants: a randomised phase 1b/2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 18, n.8, p. 923-934, 2016.

MELIN, P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. **Clinical Microbiology Infection**. v. 17, n. 9, p. 1294-1303, 2011.

MELO, S. C. C. S. DE et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 83, 2016.

MORALEDA C. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of group B streptococcus isolated among pregnant women and newborns in Rabat, Morocco. **Journal of Medical Microbiology**. v. 65, n 5, p. 652-661, 2018.

MURRAY, P, R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M, A. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2015.

NAGAO, P, E. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci). **Molecular Medical Microbiology**, Elsevier, 2015.

NANDURI, S. A. et al. Epidemiology of Invasive Early-Onset and Late-Onset Group B Streptococcal Disease in the United States, 2006 to 2015: Multistate Laboratory and Population-Based Surveillance. **JAMA Pediatrics**. v. 173, n. 3, p. 224-33, 2019.

NASCIMENTO, C, S. *Streptococcus agalactiae* -Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana. 2019. 67f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

NKEMBE, M. et al. *Streptococcus agalactiae* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern in vaginal and anorectal swabs of pregnant women at a tertiary hospital in Cameroon. **BMC Research Notes**. v. 11, n. 480 p. 1-6, 2018.

NUCCITELLI A; RINAUDO, C. D; MAIONE D. Group B Streptococcus vaccine: state of the art. **Therapeutic Advances in Vaccines**. v. 3, n. 3, p. 76-90, 2015.

OLIVEIRA, M. V.; et al. Prevalência e fatores de risco associados à colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas no Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista – BA. **Ciência & Desenvolvimento – Revista Eletrônica da FAINOR**, v.6, n.1, p.172-184, 2013.

OLIVEIRA, T, V. et al. Streptococcus agalactiae: Sensitivity profile in pregnant women attending health units in northeastern Brazil. **World Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 9, p. 11-17, 2020.

OTAGUIRI, E. S. et al. Commensal Streptococcus agalactiae isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiology**. v.13, n. 297, p. 1-9, 2013.

OVIEDO, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of Streptococcus agalactiae in pregnant women. First study in a province of Argentina. **Brasilian Journal of Microbiology**. v.44, n. 1, p. 253- 258, 2013.

PINTO A. M, et al. Incidence and serotype characterisation of Streptococcus agalactiae in a Portuguese hospital. **Journal of Clinical Pathology**. 2018; v. 71, n. 6, p. 508-513, 2018.

Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797. **Obstetricians and Gynecologists**. v. 132, n.2, p. 51-72, 2020.

RAABE, V. N; SHANE, A. L. Group B *Streptococcus (Streptococcus agalactiae)*. *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018. PMID: 30900541; PMCID: PMC6432937.

SANTANA, F. A. F; et al. Streptococcus agalactiae: Identification methods, antimicrobial susceptibility, and resistance genes in pregnant women. **World of Journal Clinical Cases**. v. 8, n. 18, p. 3988-3998, 2020.

SCHAECHTER, M; et al. *Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002.

SHABAYEK S; ABDALLA S. Macrolide- and tetracycline-resistance determinants of colonizing group B streptococcus in women in Egypt. **Journal of Medical Microbiology**. v. 63, n. 10. p. 1324-1327, 2014.

SHABAYEK, S; SPELLERBERG, B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-14, 2018.

SHUNMING LI, et al. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* in a mother-baby prospective cohort study: Implication for vaccine development and insights into vertical transmission. **Vaccine**, n. 36, p. 1941–1948, 2018.

SILVA, F. A.; VIDAL, C. F. D. L.; ARAÚJO, E. C. Validation of the content of the prevention protocol for early sepsis caused by *Streptococcus agalactiae* in newborns. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. p. 635-641, 2015.

SIMOES et al. Phenotypical characteristics of group B streptococcus in parturients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2007, vol.11, n.2, p.261-266, 2007.

SIQUEIRA, F. Colonização de pacientes grávidas por *Streptococcus agalactiae* em Taguatinga, Distrito Federal, Brasil. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017.

SOARES. G. C. T. et al. Prevalence of Group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, 3, p. 869-872, 2013.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. *Microbiologia*. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TORRES, S. I. F. *Streptococcus agalactiae*, avaliação da resistência a macrólidos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de Aveiro, 2012.

VEKEMANS J; et al. The role of immune correlates of protection on the pathway to licensure, policy decision and use of group B *Streptococcus* vaccines for maternal immunization: considerations from World Health Organization consultations. **Vaccine**. v. 37, n. 24, p.3190-3198, 2019.

YOON, I.A. et al. Clinical significance of serotype V among infants with invasive group B streptococcal infections in South Korea. **International Journal Infectious Diseases**. v.38: p. 136–40, 2015.

# CAPÍTULO 1

**Submitted to:** Maternal Fetal Medicine

**Manuscript Number:** MFM-21-018

**Article Type:** Review

**DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF SOROTYPES OF *Streptococcus agalactiae*  
ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN IN 30 COUNTRIES: A SYSTEMATIC  
REVIEW**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MFM-21-018
<b>Full Title:</b>	DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF SOROTYPES OF <i>Streptococcus agalactiae</i> ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN IN 30 COUNTRIES: A SYSTEMATIC REVIEW
<b>Article Type:</b>	Review
<b>Keywords:</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; serotype; pregnant women
<b>Corresponding Author:</b>	Fabrício Freire de Melo, Ph.D. Universidade Federal da Bahia Vitória da Conquista, Bahia BRAZIL
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	freiremelo@yahoo.com.br
<b>First Author:</b>	Marta Maria Silva
<b>Other Authors:</b>	Marta Maria Silva
	Érica Alcântara Silva
	Caline Novais Teixeira Oliveira
	Maria Luísa Cordeiro Santos, Graduate Student
	Cláudio Lima Souza
	Márcio Vasconcelos Oliveira
<b>Order of Authors (with Contributor Roles):</b>	Marta Maria Silva
	Érica Alcântara Silva
	Caline Novais Teixeira Oliveira
	Maria Luísa Cordeiro Santos, Graduate Student
	Cláudio Lima Souza
	Fabrício Freire de Melo
	Márcio Vasconcelos Oliveira



**Abstract:**

**INTRODUCTION** Group B *Streptococcus agalactiae* (GBS) is an important etiologic agent related to neonatal infection, triggering pneumonia, meningitis and sepsis.

Pregnant women are the main reservoir of this microorganism, with ability of transmitting through the vaginal tract. This review was motivated by the importance of this microorganism in the context of public health, given its impact on neonatal morbidity and mortality. **METHODS** This is a systematic review that addresses the distribution and prevalence of GBS in pregnant women. The search was composed of studies published between January 2010 and December 2019 in PubMed, VHL, Science Direct, SciELO and Lilacs databases. We surveyed relevant articles published in English, Spanish, and Portuguese between February and April 2020. Original articles, communication, report, theses and dissertations were included. Studies that analyzed GBS isolates from pregnant women and were removed from the same anatomical sites of isolation were also included.

**RESULTS** 48 papers were included in this review. The biological samples for isolation of the microorganism came mostly from Swab anovaginal collection, using Molecular Biology and agglutination by latex for identification. The ten serotypes of *Streptococcus agalactiae* were detected, with Ia, Ib and II-V being the most prevalent and Ia, Ib, II and III being linked to diseases in neonates. In addition, resistance to antibiotics was mainly associated with strains of sera types Ia-V. **CONCLUSION** The review showed variation in the distribution and prevalence of serotypes in the 30 countries, pointing out their relationship with maternal colonization, the implications for neonates and resistance to antibiotics.

Dear Editor,

I forward the manuscript "DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF SOROTYPES OF *Streptococcus agalactiae* ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN IN 30 COUNTRIES: A SYSTEMATIC REVIEW" for

publication in this valuable means of scientific communication. This systematic review addresses the distribution and prevalence of Group B *Streptococcus* in pregnant women, compiling scientific data on distribution and prevalence of serotypes of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in several countries.

We declare that all of the data described in this study were not plagiarized and that if accepted to publication, all copyrights are automatically transferred to this journal. We also declare that the author's order will not be altered.

Best regards,

Marta Maria Silva, Érica Alcântara Silva, Caline Novais Teixeira Oliveira, Maria Luísa Cordeiro Santos, Cláudio Lima Souza, Fabrício Freire de Melo, Márcio Vasconcelos Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Author's affiliation: Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista 45029-094, Bahia, Brazil.

**Title:** DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF SOROTYPES OF *Streptococcus agalactiae* ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN IN 30 COUNTRIES: A SYSTEMATIC REVIEW

**Running title:** *Streptococcus agalactiae* in pregnancy: a review

**Authors:** Marta Maria Silva<sup>1</sup>, Érica Alcântara Silva<sup>1</sup>, Caline Novais Teixeira Oliveira<sup>1</sup>, Maria Luísa Cordeiro Santos<sup>1</sup>, Cláudio Lima Souza<sup>1</sup>, Fabrício Freire de Melo<sup>1</sup>, Márcio Vasconcelos Oliveira<sup>1</sup>

**Author's institutional affiliations:** <sup>1</sup>Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista 45029-094, Bahia, Brazil.

**ORCIDid number:** Marta Maria Silva (0000-0002-1957-8801); Érica Alcântara Silva (0000-0002-3596-2731); Caline Novais Teixeira Oliveira (0000-0003-3094-4363); Maria Luísa Cordeiro Santos (0000-0001-7078-9789); Cláudio Lima Souza (0000-0002-8094-8357); Fabrício Freire de Melo (0000-0002-5680-2753); Márcio Vasconcelos Oliveira (0000-0002-8959-0478)

**Corresponding author:** Fabrício Freire de Melo, PhD, Postdoctoral Fellow, Professor, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Rua Hormindo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58, Vitória da Conquista 45029-094, Bahia, Brazil.

[freiremelo@yahoo.com.br](mailto:freiremelo@yahoo.com.br) Telephone: +55-77-991968134

## 1. INTRODUCTION

*Streptococcus agalactiae* or Group B *streptococcus* (GBS) is an encapsulated gram-positive bacterium that can colonize the human gastrointestinal and genitourinary tracts. Pregnant women are the main reservoir of this microorganism, with ability of transmitting and triggering infections in neonates [1-4] with emphasis on pneumonia, meningitis and sepsis [5,6], being related to important morbidity and mortality indexes [3]. In Brazil, the severity of infections and the scarcity of data on the colonization of GBS in pregnant women represents a public health problem [4]. Anovaginal and prenatal screening between the 35th and 37th weeks of gestation and intrapartum prophylactic antibiotic therapy is a procedure recommended by the Center for Diseases Control and Prevention (CDC) [7], and can reduce the risk of infection by up to 78% GBS in neonates [4].

GBS has virulence factors that favor invasion, colonization and pathogenesis, with the sialylated capsular polysaccharide (SCP) being the most relevant one [8-13], as it provides protection against the host's immune defense system, causing the microorganism to escape from phagocytosis[14]. Based on SCP antigenicity, there are ten described serotypes (Ia, Ib, II-IX)[8,14]. Thus, the identification of these serotypes is important for determining the capacity for aggression and antimicrobial resistance[15], in addition to contributing to the knowledge of the epidemiology of the disease and the development of vaccines[3,14].

The serotype determination process uses techniques such as latex agglutination and Polymerase Chain Reaction (PCR) [16,17]. In the first technique, specific antibodies are used for capsular polysaccharides, which are available in reliable and easy to use commercial kits[9], while the second is based on the amplification of the nucleotide sequence of the genes responsible for the capsular constituents, with greater sensitivity and specificity in the identification of GBS[16].

Serotypes Ia, Ib, II, III and V are the most infectious and are most related to the disease process worldwide[8,14]. The distribution and prevalence vary according to the geographical location, clinical origin of the strain and the ethnic origin of the population[3,4,17-19].

This review was motivated by the importance of this microorganism in the context of public health, given the importance of GBS serotypes with maternal colonization and impact on neonatal morbidity and mortality. In addition, it also aimed to point out the variation in the distribution and prevalence of serotypes in different regions and the related epidemiological aspects.

Thus, the aim of the study was to compile data on scientific production in the last 10 years involving GBS in pregnant women. It is also hoped that this review can serve as a source of consultation, enabling understanding in the area, and that the applicability of this knowledge can be useful in the adoption of appropriate conducts in coping with diseases caused by GBS.

## 2. METHODS

This is a systematic review conducted in accordance with the PRISMA statement checklist recommendation.

### Eligibility Criteria

**Types of study:** We included productions that addressed the distribution and prevalence of GBS serotypes in pregnant women, published between January 2010 and December 2019, published in English, Portuguese and Spanish. Original articles, communication, report, theses and dissertations were included. Review articles and articles not available in free version were excluded.

**Types of participants:** Pregnant women colonized by GBS whose samples came from anovaginal collection. Studies that analyzed GBS isolates from pregnant women and were removed from the same anatomical sites of isolation were included.

**Types of outcome measures:** Determination of the distribution and prevalence of isolated GBS serotypes in pregnant women.

### Information sources

We surveyed the relevant articles published in the English, Spanish, and Portuguese languages between February and April 2020 in the United States National Library of Medicine (PubMed), *Biblioteca Virtual de Saúde* (BVS), Science Direct, Scientific

Electronic Library Online (SciELO), *Literatura da América Latina e do Caribe em Ciências da Saúde* (Lilacs) databases.

### **Search**

As a search strategy, the following terms were used in the databases: PubMed, BVS and Science Direct (serotypes and *Streptococcus agalactiae* and pregnant women); Lilacs (serogroup and *Streptococcus agalactiae* and pregnant women) and SciElo (serotype and *Streptococcus agalactiae*).

### **Study selection**

Two authors (Silva M.M; Silva E.A) performed the selection of articles independently. Subsequently, duplication was checked and excluded, followed by reading and selecting abstracts, excluding those that did not deal with the distribution and prevalence of serotypes of pregnant women. Finally, the articles were read in full, including only those that met the eligibility criteria. Doubts were resolved by consensual decision of the authors.

### **Data Collection Process**

After reading the articles, information was selected to compose the list of data that would be necessary for the analyzes.

### **Data Items**

Information was extracted from each study on: year of publication, language, geographic location, objectives, methodology, prevalence of colonization, gestational period, method for capsular serotyping, antimicrobial resistance and distribution and prevalence of serotypes.

### **Assessment of quality of studies**

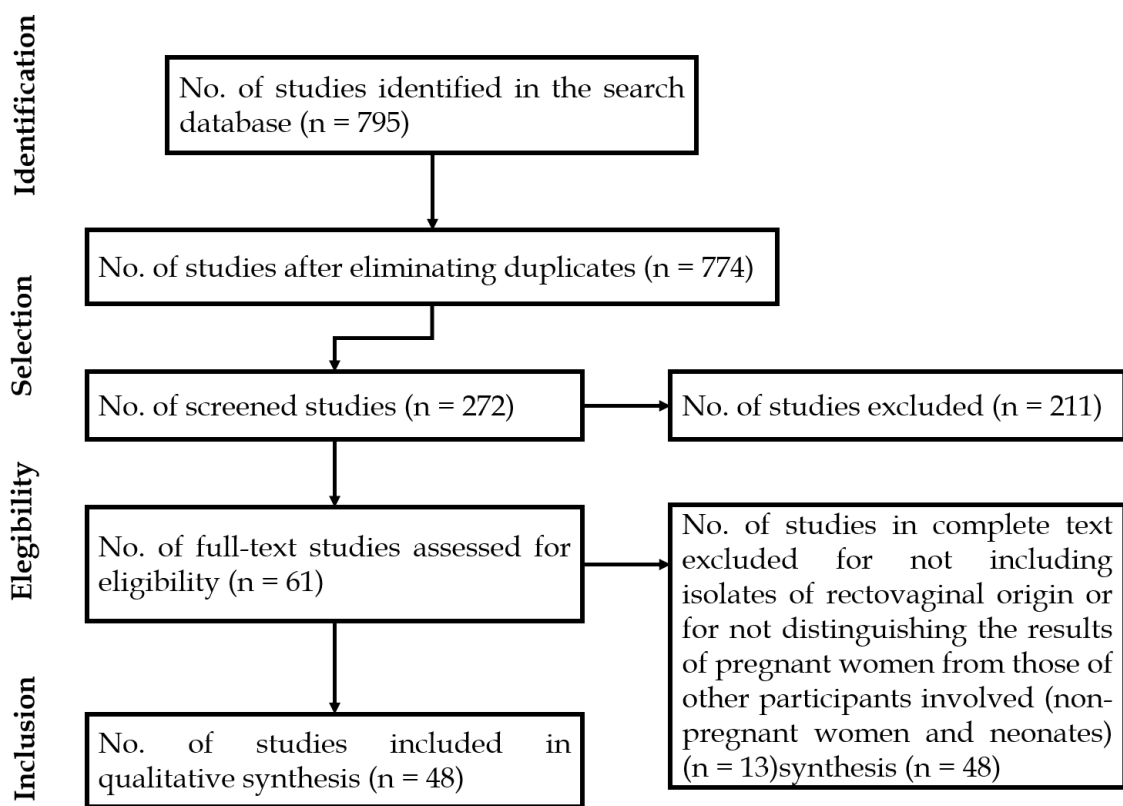
The reviewers worked independently and determined the main risks of production bias, verifying that in the cohort studies, selection bias and loss of follow-up were the main ones. Cross-sectional studies showed a higher risk for selection, detection and memory bias. For the randomized controlled clinical trial, there was a risk of selection, detection and performance bias.

## **3. RESULTS**

## Study Selection

After applying the terms, 795 articles were found, distributed as follows: 167 in PubMed, 176 in VHL, 448 in Science Direct, 2 in SciELO and 2 in Lilacs.

Using previously established eligibility criteria, 48 productions were selected and make up the present review, with 44 articles, 2 theses and 2 dissertations. **[Figure 1]** shows the selection and distribution of publications according to the databases searched from the first search to application of all selection criteria.



## Study Characteristics

Most works were published in the period between 2014 to 2017 (45.8% / n = 22), followed by publications between 2010 to 2013 (27.0% / n = 13) and 2018 to 2019 (27.0% / n = 13). The predominant language of publications was English (87.5% / n = 42), followed by Portuguese (8.3% / n = 4) and Spanish (4.1% / n = 2).

Regarding the distribution of articles regarding geographical location, it was found that Asia (33.3% / n = 16), America (25% / n = 12), Africa (22.9% / n = 11) and Europe (16.6% / n = 8) were the continents with the highest production on the topic,

followed by Western Australia where the number of publications was lower (2.0% / n = 1).

The main methodology used in publications was the cross-sectional study (85.4% / n = 41). A cohort study (12.5% / n = 6) and a randomized clinical trial (2.1% / n = 1) were also performed. Regarding the data source, available in **[Table 1]**, most were performed through the collection / analysis of biological samples (66.6% / n = 32), followed by analysis of biological samples associated with the application of questionnaires and interviews (22.9% / n = 11) and analysis of biological sample associated with secondary data (medical records, laboratory record, exam registration form and personal data sheet (10.4% / n = 5).

**Table 1.** Methodological characteristics of the studies.

Study design	N	%
Cross-sectional study	41	85,4
Cohort	06	12,5
Ensaio clínico randomizado	01	2,1
<b>Database</b>		
Biological sample	32	66,6
Biological sample, Interview and Questionnaire	11	22,9
Biological sample and others ( <i>medical records, laboratory record, exam registration form and personal data sheet</i> )	05	10,4
<b>Types of projects</b>		
Unicentric	32	65,9
Multicentric	16	34,0



Biological samples were collected using swabs from the following anatomical sites: Vagina and rectum (Single swab - 58.3% / n = 28); vagina (single swab - 20.8% / n = 10), vagina and rectum (2 swabs, one for each site - 14.5% / n = 7), vagina, rectum and a combined vagina / rectum sample (one swab for each site - 6.2% / n = 3).

Among the studies that reported gestational age at the time of collection, it was found that most pregnant women were in the third trimester (64.5% / n = 31), noting that most of these were between the 35th to the 37th weeks. In some studies, collection was performed only at delivery (14.5% / n = 7). In addition, in two studies the collection was carried out both in women attended in prenatal care, with gestational age between 28 and  $\geq 30$  weeks, and in those attended at the time of delivery (4.16% / n = 2). Some publications did not report the gestational period (14.5% / n = 7) and one study chose to collect from pregnant women in any gestational period (2.0% / n = 1).

All studies aimed (primary or secondary) to determine the prevalence and distribution of GBS serotypes in pregnant women. This objective was achieved by identifying 8,389 isolates from colonized pregnant women out of a total of 46,208 who were recruited for the studies under analysis and had colonization rates ranging from 4.9% to 33.7%. For the identification of serotypes, most studies used the Molecular Biology (PCR) technique (41.6% / n = 20) followed by the latex agglutination technique (29.1% / n = 14) and the use of both the techniques (29.1% / n = 14). In the studies, the record of non-typable isolates - NT (47.9% / n = 23) was verified.

There were records of all 10 GBS serotypes (Ia, Ib, II - IX) among the countries analyzed, but the distribution and prevalence were varied, according to data listed in **[Table 2]**. In studies carried out in Brazil included in this review, which correspond to 16.6% of the selected articles, serotypes Ia, III and V were indicated as the most prevalent.

**Table 2: Prevalence of GBS in the countries analyzed.** In bold, the percentage of the most prevalent serotype.

Author / Year	Countries	Distribution and Prevalence of GBS Serotypes isolated from pregnant women (%)									
		Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
CHUKWU et al./ 2015	South Africa	25,8	8,6	15,6	<b>29,7</b>	8,6	10,9				
SLOTVED et al./ 2017	Ghana	3,57		1,7	3,5	5,3	5,3		<b>42,8</b>	5,3	32,1
BURCHAM et al/2019	United States of America	12,8	15,4	15,4	25,6	12,8	<b>28,2</b>				
LU et al/2014	China	21,4	11,9	7,0	<b>41,8</b>		14,9	1,5	0,5		
KUNZE et al/2011	Germany	16,0	19,0	12,0	<b>28,0</b>	6,0	15,0				
TURNER et al/2012	Ásia			<b>26,3</b>					<b>26,3</b>		
CLOUSE et al/2019	Jordan	24,0	20,0		<b>48,0</b>		8,0				
PINTO et al/ 2017	Portugal	19,4	17,9	10,4	<b>22,4</b>	7,5	17,9	1,5			
YAN et al, 2016	China	22,5	10,4	5,2	<b>35,9</b>		21,2	1,3	0,9		
BRZYCHCZY-WŁOCH et al/2011	Poland	20,0	8,0	15,0	<b>35,0</b>	5,0	17,0				
ANDRADE et al/ 2017	Brazil	<b>46,0</b>	7,0	17,0	10,0		20,0				
SOARES et al/ 2013	Brazil	6,0	6,0	9,09	<b>39,3</b>		24,2				
MUKESI et al/ 2019	Namibia and South Africa		<b>60,0</b>	2,6	25,2	1,7	10,4				
		9,0	3,0	<b>52,2</b>	17,9	1,5	16,4				
HASSAN et al/2019	Iraq	22,2	11,1	5,5	8,3	<b>30,5</b>	19,4	2,7			
ALI et al/ 2019	Ethiopia	20,5	11,4	<b>31,8</b>	13,6		18,2				
TEATERO et al/2017	Canada	23,0	13,0	9,0	<b>25,0</b>	5,0	19,0	1,0			
LOPEZ et al/2018	Spain	17,9	4,2	<b>31,6</b>	26,3	10,5	9,5				
WANG et al/ 2015	China	17,9	16,1	5,4	<b>32,1</b>		14,3				
BOTELHO et al/2018	Brazil	<b>37,3</b>	11,2	19,9	6,8	3,5	9,1				
BELARD et al/2015	Gabon	12,8	22,9	6,4	27,5		<b>30,3</b>				
Jl et al/2017	China	17,7	13,1		<b>54,9</b>		6,5	1,3		0,7	

**Table 2: Prevalence of GBS in the countries analyzed.** CONTINUATION. In bold, the percentage of the most prevalent serotype.

Author / Year	Countries	Distribution and Prevalence of GBS Serotypes isolated from pregnant women (%)										
		Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
ELIKWU et al/2016	Nigeria	<b>23,9</b>	19,5	17,3	21,7		15,2	2,1				
CORRÊA et al /2011	Brazil	<b>33,2</b>	1,9	17,6	5,88		15,6			1,6		
OVIEDO et al/2013	Argentina	40,0	9,0	10,0	21,0		12,0					4,0
MOROZUMI et al/2015	Japan	15,6	<b>20,8</b>		16,9							
DOARE et al/2016	Gambia	8,4	6,7	16,4	10,1		<b>54,8</b>					
SEOUD et al/2010	Lebanon	14,6	6,6	10,9	16,1	0,7	<b>22,6</b>					
NASCIMENTO/2019	Brazil	<b>47,2</b>	2,2	4,5	20,4		15,9					2,9
LEE et al /2019	Korea		21,1	10,5	<b>42,1</b>	5,3	15,8	5,3				
HEARN-THOMAS/2019	Botswana	20,8	3,8	3,8	22,6	1,9	<b>45,3</b>					
SADEH et al/2016	Iran	16,7	6,7	20,0	<b>50,0</b>		6,7					
MAVENYENGWA et al/2010	Zimbabwe	15,7	11,6	8,3	<b>38,8</b>		24,0					
WANG et al / 2018	China	22,11	7,69		<b>49,0</b>		18,2					
FEUERSCHUETTE/2018	Brazil	<b>35,5</b>	1,5	21,5	9,6	3,7	26,6		0,7	0,7		
SIQUEIRA/2017	Brazil	<b>49,0</b>	7,5	9,0	1,5		31,1			1,5		
BOTELHO/2014	Brazil	<b>41,0</b>	11,0	26,0	11,0		11,0					
FRÖHLICHER et al / 2014	Switzerland	19,2			<b>29,4</b>		25,5					
SAHA et al /2017	Bangladesh	<b>40,0</b>		14,0	12,0		23,0					
SHABAYEK et al /2013	Egypt	8,0	10,0	13,0	19,0	2	<b>40,0</b>	10,0				
HONG et al / 2010	Korea	13	6,8	5,6	<b>35,6</b>	2,3	24,3					
KIMURA et al /2013	Japan	7,0	12,0	11,0	10,0		<b>22,0</b>	13,0	1,0	9,0		
GARCÍA et al/2011	Colombia	0,38										
LIÉBANA-MARTOS et al/2014	Spain		3,2		<b>31,6</b>	4,6						3,2
LIN et al/2016	China		12,5		25,0		25,0	<b>37,5</b>				

**Table 2: Prevalence of GBS in the countries analyzed.** CONTINUATION. In bold, the percentage of the most prevalent serotype.

Author / Year	Countries	Distribution and Prevalence of GBS Serotypes isolated from pregnant women (%)									
		Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
LIAKOPOULOS et al/2014	Greece		20,4		<b>52,0</b>	26,3	1,1				
BRIGTSEN et al/2014	Norway	15,7	9,8	13,8	<b>24,8</b>	14,0	16,9	0,4		0,7	2,6
KWATRA et al/2014	South Africa	<b>31,3</b>	3,5	10,3	10,3	2,0	7,2				3,3
FURFARO et al/2019	Western Australia	<b>27,9</b>	8,4	16,3	20,9	2,8	15,8	5,1		0,5	0,5

Another relevant aspect observed in this review concerns the susceptibility and resistance to antibiotics such as penicillin, clindamycin, erythromycin and vancomycin, which have been associated with the GBS serotype in certain studies (27.0% / n = 13).

#### 4. DISCUSSION

This review compiles information from 48 publications on the distribution and prevalence of GBS serotypes isolated from colonized pregnant women. The colonization rate in pregnant women ranged from 4.9% to 33.7%, reported in China<sup>[20]</sup> and Gambia<sup>[21]</sup>, respectively. This colonization can occur asymptotically in the vagina and rectum<sup>[22]</sup>, however GBS is recognized as a disease-causing agent in neonates<sup>[23]</sup>. About 50 to 70% of colonized pregnant women can transmit GBS vertically to the newborn in the uterus via the ascending route or at the time of delivery, with 1-3% of colonized neonates developing invasive diseases<sup>[22,24-27]</sup>, if prophylactic or therapeutic measures are not taken<sup>[28]</sup>. Thus, colonization by GBS in pregnant women is quite relevant, as it provides and increases the risk of these diseases<sup>[28,29]</sup>.

Diseases in neonates caused by GBS can start early (manifesting until the seventh day of life) or late (manifesting between 7 days and up to three months of life)<sup>[23,30-32]</sup>, characterizing as the main causes of neonatal morbidity and mortality<sup>[20,33,34]</sup> and can trigger pneumonia, sepsis or meningitis with various levels of severity, with 30% to 50% of neonates progressing with neuropsychomotor sequelae and an estimate of 10% has a fatal outcome<sup>[24]</sup>.

Among the measures adopted to reduce the vertical transmission of GBS, many studies analyzed have endorsed the CDC recommendations that recommend universal screening for detection in the anovaginal tract between the 35th and 37th weeks of pregnancy and prophylactic intrapartum antibiotic therapy<sup>[3,18,23,24,28,31-33,35,36]</sup>. It was found that in 35.4% (n = 17) of the studies, the gestational time selected for sample collection occurred between 35 and 37 weeks. The delimitation of this period is important, since the state of positive colonization during pregnancy can change and it is at this stage of the gestational period that an increase in the prevalence of colonization can be detected<sup>[15,37]</sup>. It should be noted, however, that the study by Furfaro, *et al.*<sup>[38]</sup> demonstrated that there was no significant change in colonization between the second and third trimesters, calling attention to the need for early

screening, mainly because of its implications for pregnant women at high risk premature birth. According to these authors, many women in this condition are not screened for GBS.

Six studies reported that colonized pregnant women were referred for prophylaxis<sup>[4,19,23,33,36,39]</sup>, and the others presented screening information, but without an approach about prophylactic measures<sup>[2,3,6,14,16,18,22,24,28,40,41]</sup>. Among the pregnant women screened at delivery, some were treated with antibiotics<sup>[1,34,42]</sup> and the other studies do not report whether there was any type of intervention in this regard<sup>[9,21,30,35]</sup>. Two studies dedicated to the study of colonization by GBS in other gestational periods reported treatment of pregnant women<sup>[15,37]</sup>. The others provided only screening data for GBS.

In the United States, the adoption of therapeutic measures for pregnant women colonized with GBS is a common practice in late pregnancy and / or childbirth due to the high risk of infection in the newborn<sup>[8]</sup>. Teatero *et al.*<sup>[31]</sup> reinforced that the implementation of screening and the adoption of prophylactic measures collaborated to reduce early onset disease considerably in both the United States and Canada. Other countries have also adopted these recommendations. In Germany, national guidelines recommend screening<sup>[33]</sup>, in Argentina screening is mandatory in all pregnant women between 35 and 37 weeks<sup>[19]</sup>. Japan directs screening for pregnant women between 33 and 37 weeks and intrapartum antibiotic prophylaxis for positive cases<sup>[32]</sup> and in Poland guidelines have been created for preventing GBS in line with the CDC guidelines<sup>[2]</sup>. However, not all countries adopt such strategies. In China, there was a lack of specific guidelines for screening and prevention of GBS and the absence of a surveillance program to monitor the prevalence of infections among pregnant women or neonates<sup>[18,36]</sup>.

In relation to Brazil, the Pediatrics Society since 2011 recommends screening for GBS. However, compliance with the CDC's recommendations is incipient and the adherence low<sup>[3]</sup>. A study carried out in 2017 in the Brazilian Federal District, pointed out that screening was not routinely performed in hospitals and private clinics. It also added that knowledge about GBS, its prevalence, resistance and risk of infections in neonates would be necessary for the future implementation of a guideline that promotes the reduction of maternal colonization and neonatal infection<sup>[4]</sup>. Another study highlighted the need for regional investigations, which demonstrate the incidence of sepsis to

conduct prophylaxis and recommendations and reiterated the absence of national studies to assess the cost-effectiveness of intrapartum prophylaxis<sup>[7]</sup>. Feuerschuetze<sup>[24]</sup> and Botelho<sup>[15]</sup> agreed that there is no formal guidance or consensus on screening for GBS in the country. The other studies did not discuss this aspect<sup>[16,25,43]</sup>.

Regarding the relationship between clinical manifestations of diseases and GBS serotypes, a publication pointed out that most diseases in neonates are linked to serotypes Ia, Ib, II or III <sup>[4,32,44]</sup>. Serotype III has been associated with cases of meningitis and sepsis (60 to 85% late-onset diseases)<sup>[7]</sup> and in the case of meningitis, serotype III has been linked to both early-onset and late-onset disease<sup>[45]</sup>. Relationships of serotypes with invasive disease in adults and neonates<sup>[26]</sup>, with early disease (serotype IV), invasive infection in pregnant women, neonates<sup>[14,28,29]</sup> and non-pregnant women<sup>[29]</sup> (serotype V) and early-onset disease and in colonized pregnant women (serotype VI)<sup>[27]</sup>. The other serotypes VII, VIII and IX were detected in pregnant women, but were not associated with clinical manifestations<sup>[6,36]</sup>.

With regard to distribution and prevalence, studies have shown that all 10 GBS serotypes were found in the countries analyzed, albeit in a variety of ways. Serotypes Ia-V were the most prevalent and serotypes VI to IX, the rarest.

In the countries of the Asian continent<sup>[1,10,11,18,36,39]</sup> and the European <sup>[2,9,23,33,41,46,47]</sup> serotype III was the most prevalent. In these continents, the predominance of serotypes Ia<sup>[40]</sup>, IV<sup>[26,27]</sup> and V<sup>[34,44]</sup> has also been reported, and to a lesser extent serotypes VI<sup>[26]</sup>, VIII<sup>[9]</sup> and IX<sup>[9]</sup>. According to Lee and collaborators<sup>[10]</sup>, the prevalence and distribution of GBS depends on the region of the study. Wang and collaborators<sup>[18]</sup> indicated that the difference in distribution can also be associated with both the source of origin of the isolates and the technique used to identify them.

Studies carried out in the African continent<sup>[6,13,14,22,45]</sup> detected serotypes II, V, VII, III and Ia, following the order of highest prevalence. An interesting aspect regarding the variation of serotypes was addressed by Slotved and collaborators. According to these authors, geographic location can be identified as one of the causes of changes in the distribution of GBS serotypes among African countries<sup>[6]</sup>.

In Western Australia serotype Ia was the most prevalent<sup>[38]</sup>. The same study identified serotype IX for the first time in the country. The authors consider that the distribution of serotypes was in agreement with those that predominate in other

countries and that the understanding of this regional distribution could assist in clinical practice and definition of therapeutic strategies.

In South American countries<sup>[4,7,15,19,48]</sup> serotypes Ia, III and V were detected as the most prevalent. In Brazil, a study carried out in Santa Catarina, showed a higher prevalence of sera types Ia and V, and pointed out as possible justification the best adaptation of the GBS to colonize as commensals of the anovaginal tract of pregnant women. However, it has been reported that this mechanism has not yet been elucidated, but there could be a deficiency in the maternal immune response that is more effective for such serotypes<sup>[24]</sup>. It is also important to note that a study carried out in São Paulo<sup>[16]</sup> and another in Rio de Janeiro<sup>[43]</sup> identified, respectively, serotypes VI and VIII as the least prevalent, but both records were unpublished in the country.

Concerning the distribution and prevalence aspects of the aforementioned serotypes, it is noteworthy that the articles reported other studies to compare the results, referring to studies conducted within the country or coming from others, making it possible to determine whether serotypes were maintained or whether others were emerging and in which prevalence. In addition, comparisons made it possible to identify the unprecedented registration of serotypes in some locations. It is worth mentioning that the studies reinforced the need for surveillance of serotypes, at the local level, to implement more conducive actions regarding therapeutic measures for the treatment of pregnant women colonized by GBS.

Another aspect that drew attention concerns the susceptibility and resistance of the GBS to antibiotics. Intrapartum antibiotic prophylaxis represents the main measure to prevent the transmission of the microorganism to the newborn<sup>[3,8,19]</sup>. It has been indicated that penicillin is the first line of choice to treat colonized pregnant women, and clindamycin, erythromycin or vancomycin are alternatives in case of allergy to penicillin<sup>[4,8,43]</sup>. However, there was concern about resistance to antibiotics, as it may involve prophylaxis and inadequate treatment<sup>[19]</sup>. In studies conducted in Brazil, for example, resistance to clindamycin and / or erythromycin was found in isolates of serotypes Ia<sup>[4,7,16,24]</sup>, Ib<sup>[4,7]</sup>, II<sup>[4,7,15]</sup>, III<sup>[4,7,15]</sup>, V<sup>[4,7,24]</sup>, VIII<sup>[43]</sup> and IX<sup>[7]</sup>. As a result of the increase in this resistance, a study reinforced the more recent guidance of the CDC (2010) that indicates the performance of susceptibility tests in the samples of GBS before treating colonized pregnant women<sup>[15]</sup>.



In China, high rates of resistance to clindamycin (61.5%) and erythromycin (51.9%) have been detected among isolates of serotypes Ia, Ib, III and V<sup>[5]</sup> and, in addition to these serotypes, another Chinese study registered serotype II isolates with resistance to these antibiotics<sup>[18]</sup>. In Germany, strains resistant to erythromycin belonged to serotypes Ia, II, III and V<sup>[19]</sup>. Based on the verification of resistant strains, this study signaled that the use of antibiotics should be indicated with caution and emphasized the need for periodic surveillance so that the therapeutic choices are adequate for circulating strains<sup>[19]</sup>.

In Korea, serotypes III and V showed high rates of resistance to erythromycin and clindamycin<sup>[10]</sup>. In Japan, on the other hand, increased resistance to erythromycin and clindamycin was shown when compared to previous studies. In an interval of 13 years, resistance to erythromycin changed from 3% to 10.1% and clindamycin increased from 1% to 5% in vaginal samples of pregnant women. There was no link between resistance and GBS serotype, but the need for careful monitoring of antimicrobial susceptibility was highlighted<sup>[44]</sup>.

In the United States, a study has shown that strains of sera types Ia, Ib, II, III, IV and V, in addition to being resistant to clindamycin and / or erythromycin, were also resistant to vancomycin, and among serotypes II, IV and V were isolates resistant to penicillin were found<sup>[8]</sup>. This study was very important, because in addition to demonstrating the rise in resistance to penicillin in vaginal isolates and its possible link to specific serotypes, it suggested that serotyping may be effective to guide the treatment of pregnant women colonized by GBS before delivery.

Another important aspect in this review was the highlight of two main methods for GBS capsular serotyping. The first was observed in 29.1% of publications using the latex agglutination test. In several studies, the use of the Strep-B-Latex kit (Statens Serum Institut, Denmark) has been verified<sup>[6,16-19,24,30,35,36,47,46,48]</sup>. However, it was pointed out that this method can fail due to the quality of the antibodies used or the absence or low expression of the CPS. In addition, it can generate a rate considered high for non-typable strains and misclassification<sup>[16]</sup>. Among the studies that used this test and presented non-typable strains, the rate varied between 3.57%<sup>[18]</sup> to 27.45%<sup>[43]</sup>. The second method was the use of PCR in 41.6% of the studies. Mainly used were the protocol established in 2007 by Poyart and collaborators (22.9% / n = 11) and the Multiplex PCR protocol developed in 2010 by Imperi and collaborators (31.2% / n =

15), which allows the detection of the 10 GBS serotypes in a single reaction and identifies strains not typable by latex<sup>[16]</sup>. Three studies used real-time PCR (6.5% / n = 3)<sup>[1,29,32]</sup>, with a protocol for identifying sera types Ia, Ib and III only<sup>[32]</sup>. The studies that used these protocols resulted in non-typable strains, whose rate varied between 0.622 to 5.88%<sup>[31]</sup>. It should be noted that a non-typable strain was defined as one that the method did not allow to identify it in any serotype<sup>[18]</sup>.

## 5. CONCLUSION

Given the analyzed works, it was possible to notice that there was production on the theme in five continents. The compilation of information served to reinforce that GBS serotypes are distributed differently across countries and that some are more prevalent than others and have distinct pathogenic potential. In addition, this review incorporated other aspects that are crucial for understanding epidemiology and suggested that the adoption of measures such as screening for GBS in pregnant women and intrapartum prophylaxis may be good strategies for reducing the occurrence of diseases in neonates. In Brazil, the findings included in this survey were produced in three states and the Federal District, demonstrating a scarcity of national studies, which makes it impossible to have a broader view of the distribution and prevalence of serotypes in the country. In general, it is a consensus that understanding the distribution and prevalence of serotypes, even based on regional studies, is indispensable for making more efficient decisions and adequate coping with this microorganism and reducing undesirable complications associated with GBS in all countries by health system.

**Conflict-of-interest statement:** No potential conflicts of interest. No financial support

**PRISMA 2009 Checklist statement:** PRISMA checklist was assessed for this article. Author contributions: All authors equally contributed to this paper with conception and design of the study, literature review and analysis, drafting and critical revision and editing, and final approval of the final version.

## REFERENCES

1. **Clouse K**, Shehabi A, Suleimat AM, et al. High prevalence of Group B Streptococcus colonization among pregnant women in Amman, Jordan. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019; **19**(1): 1-8. [doi: 10.1186/s12884-019-2317-4]
2. **Brzychczy-Włoch M**, Gosiewski T, Bodaszewska-Lubas M, Adamski P, Heczko PB. Molecular characterization of capsular polysaccharides and surface protein genes in relation to genetic similarity of group B streptococci isolated from Polish pregnant women. *Epidemiol Infect*. 2012; **140**(2): 329-336. [doi: 10.1017/S0950268811000616]
3. **Botelho ACN**, Oliveira JG, Damasco AP, et al. Streptococcus agalactiae carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *PLoS One*. 2018; **13**(5): 1-12. [doi: 10.1371/journal.pone.0196925]
4. **Siqueira F**. Colonização de pacientes grávidas por *Streptococcus agalactiae* em Taguatinga Distrito Federal, Brasil. 2017. Available at: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/148701>.
5. **Yan Y**, Hu H, Lu T, et al. Investigation of serotype distribution and resistance genes profile in group B Streptococcus isolated from pregnant women: a Chinese multicenter cohort study. *Apmis*. 2016; **124**(9): 794-799. [doi: 10.1111/apm.12570]
6. **Slotved HC**, Dayie NTKD, Banini JAN, Frimodt-Møller N. Carriage and serotype distribution of Streptococcus agalactiae in third trimester pregnancy in southern Ghana. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2017; **17**(1). [doi: 10.1186/s12884-017-1419-0]
7. **Nascimento, CS**. *Streptococcus agalactiae* -Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana. 2019. 67f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Available at: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/biblio-999556>.
8. **Burcham LR**, Spencer BL, Keeler LR, et al. Determinants of Group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. *PLoS One*. 2019; **14**(12): 1-16. [doi: 10.1371/journal.pone.0226699]

9. **Brigtsen AK**, Dedi L, Melby KK, et al. Comparison of PCR and serotyping of Group B Streptococcus in pregnant women: The Oslo GBS-study. *J Microbiol Methods*. 2015; **108**: 31-35. [doi: 10.1016/j.mimet.2014.11.001]
10. **Lee HT**, Kim SY, Park PW, et al. Detection and genomic analysis of genital group B streptococcus in pregnant Korean women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019; **45**(1): 69-77. [doi: 10.1111/jog.13810]
11. **Sadeh M**, Firouzi R, Derakhshandeh A, Khalili MB, Kong F, Kudinha T. Molecular characterization of streptococcus agalactiae isolates from pregnant and non-pregnant women at yazd university hospital, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2016; **9**(2): 0-5. [doi: 10.5812/jjm.30412]
12. **Shabayek S**, Abdalla S, Abouzeid AM. Serotype and surface protein gene distribution of colonizing group B streptococcus in women in Egypt. *Epidemiol Infect*. 2014; **142**(1): 208-210. [doi: 10.1017/S0950268813000848]
13. **Mavenyengwa RT**, Maeland JA, Moyo SR. Serotype markers in a Streptococcus agalactiae strain collection from Zimbabwe. *Indian J Med Microbiol*. 2010; **28**(4): 313-319. [doi: 10.4103/0255-0857.71819]
14. **Mukesi M**, Iweriebor BC, Obi LC, Nwodo UU, Moyo SR, Okoh AI. Prevalence and capsular type distribution of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Namibia and South Africa. *BMC Infect Dis*. 2019; **19**(1). [doi:10.1186/s12879-019-3809-6]
15. **Botelho ACN**. Detecção e caracterização de Streptococcus do grupo B associado à colonização de gestantes no Rio de Janeiro. 2014:106. Available at:[https://minerva.ufrj.br/F/4RLBV9T57DG42J7M33AI5SFB518QTDCP2PNQFQG3MIIDQQ6NER-10653?func=item-global&doc\\_library=UFR01&doc\\_number=000826703&year=&volume=&sub\\_library=57](https://minerva.ufrj.br/F/4RLBV9T57DG42J7M33AI5SFB518QTDCP2PNQFQG3MIIDQQ6NER-10653?func=item-global&doc_library=UFR01&doc_number=000826703&year=&volume=&sub_library=57).
16. **Andrade PD**, Russo J de S, Gouveia JB, et al. Molecular Characterization of Group B Streptococcus Serotypes By Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Med Express*. 2017; **4**(4). [doi: 10.5935/medicalexpress.2017.04.06]
17. **Chukwu MO**, Tinago Mavenyengwa R, Monyama CM, et al. Antigenic Distribution of *Streptococcus agalactiae* Isolates from Pregnant Women at Garankuwa Hospital-South Africa.; 2015. *GERMS* **5**(4): 126-133. Available at: [www.germs.ro](http://www.germs.ro)

18. **Wang P**, Tong JJ, Ma XH, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One*. 2015;10(3). doi:10.1371/journal.pone.0120035.
19. **Oviedo P**, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Streptococcus agalactiae* in Pregnant Women. First Study in a Province of Argentina. 2013; *Brazilian J Microbiol* **44** (1): 253-258. Available at: [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br).
20. **Wang X**, Cao X, Li S, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* colonized in Chinese pregnant women: predominance of ST19/III and ST17/III. *Res Microbiol*. 2018; **169**(2): 101-107. [doi: 10.1016/j.resmic.2017.12.004]
21. **Doare K**, Jarju S, Darboe S, et al. Risk factors for Group B *Streptococcus* colonisation and disease in Gambian women and their infants. *J Infect*. 2016; **72**(3): 283-294. [doi: 10.1016/j.jinf.2015.12.014]
22. **Lu B**, Li D, Cui Y, Sui W, Huang L, Lu X. Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China. *Clin Microbiol Infect*. 2014; **20**(6). [doi: 10.1111/1469-0691.12416]
23. **Pinto AM**, Pereira TA, Alves V, Araújo A, Lage OM. Incidence and serotype characterisation of *Streptococcus agalactiae* in a Portuguese hospital. *J Clin Pathol*. 2018; **71**(6):508-513. [doi: 10.1136/jclinpath-2017-204646]
24. **Fuerschuetz OHM**. – Diversidade genética e características fenotípicas do estreptococo do grupo B do trato anogenital de gestantes. Tese (Doutorado EM Ciências da Saúde) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018. Available at: <https://riuni.unisul.br/handle/12345/4823>.
25. **Soares GCT**, Alviano DS, Santos G da S, Alviano CS, Mattos-Guaraldi AL, Nagao PE. Prevalence of group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2013; **44**(3):869-872. [doi: 10.1590/S1517-83822013000300032]
26. **Hassan JS**, Saleh RF, Abdulrahman TR. Serotype Identification of Group B *Streptococci* isolated from Iraqi pregnant women. *Pren. Méd. Argent*. 2019; **105**(8): 456-460.
27. **Lin HC**, Chen CJ, Chiang KH, et al. Clonal dissemination of invasive and colonizing clonal complex 1 of serotype VI group B *Streptococcus* in central

- Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016; **49**(6): 902-909. [doi: 10.1016/j.jmii.2014.11.002]
28. **López Y**, Parra E, Cepas V, et al. Serotype, virulence profile, antimicrobial resistance and macrolide-resistance determinants in *Streptococcus agalactiae* isolates in pregnant women and neonates in Catalonia, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018; **36**(8):472-477. [doi: 10.1016/j.eimc.2017.08.006]
29. **A'Hearn-Thomas B**, Khatami A, Randis TM, et al. High rate of serotype V streptococcus agalactiae carriage in pregnant women in Botswana. *Am J Trop Med Hyg.* 2019; **100**(5): 1115-1117. [doi: 10.4269/ajtmh.18-0847]
30. **Ali MM**, Woldeamanuel Y, Woldetsadik DA, et al. Prevalence of group B streptococcus among pregnant women and newborns at Hawassa University comprehensive specialized hospital, Hawassa, Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2019; **19**(1):1-9. [doi: 10.1186/s12879-019-3859-9]
31. **Teatero S**, et al. Diseases Serotype Distribution, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Recovered from Colonized Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology.* 2017; **55**(2): 412-422.
32. **Morozumi M**, Chiba N, Igarashi Y, et al. Direct identification of *Streptococcus agalactiae* and capsular type by real-time PCR in vaginal swabs from pregnant women. *J Infect Chemother.* 2014; **21**(1): 34-38. [doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.024]
33. **Kunze M**, Ziegler A, Fluegge K, Hentschel R, Proempeler H, Berner R. Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany. *J Perinat Med.* 2011; **39**(4): 417-422. [doi: 10.1515/JPM.2011.037]
34. **Seoud M**, Nassar AH, Zalloua P, et al. Prenatal and neonatal Group B Streptococcus screening and serotyping in Lebanon: Incidence and implications. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010; **89**(3): 399-403. [doi: 10.3109/00016340903560008]
35. **Belard S**, Toepfner N, Capan-Melser M, et al. *Streptococcus agalactiae* Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility in Pregnant Women in Gabon, Central Africa. *Sci Rep.* 2015; 5. [doi: 10.1038/srep17281]
36. **Ji W**, Zhang L, Guo Z, et al. Colonization prevalence and antibiotic susceptibility

- of Group B Streptococcus in pregnant women over a 6-year period in Dongguan, China. *PLoS One*. 2017;12(8):1-10. [doi: 10.1371/journal.pone.0183083]
37. **Kwatra G**, Adrian P V., Shiri T, Buchmann EJ, Cutland CL, Madhi SA. Serotype-specific acquisition and loss of group B Streptococcus recto-vaginal colonization in late pregnancy. *PLoS One*. 2014; **9**(6). [doi: 10.1371/journal.pone.0098778]
  38. **Furfaro LL**, Nathan EA, Chang BJ, Payne MS. Group B streptococcus prevalence, serotype distribution and colonization dynamics in Western Australian pregnant women. *J Med Microbiol*. 2019; **68**(5): 728-740. [doi: 10.1099/jmm.0.000980]
  39. **Hong JS**, Choi CW, Park KU, et al. Genital group B streptococcus carrier rate and serotype distribution in Korean pregnant women: Implications for group B streptococcal disease in Korean neonates. *J Perinat Med*. 2010; **38**(4): 373-377. [doi: 10.1515/JPM.2010.050]
  40. **Saha S**, K, Ahmed, Z, Modak, J, et al. Group B Streptococcus among Pregnant Women and Newborns in Mirzapur, Bangladesh: Colonization, Vertical Transmission, and Serotype Distribution. *J Clin Microbiol*. 2017; **55**(8): 2406-2412.
  41. **Liébana-Martos MDC**, Cabrera-Alavargonzalez J, Rodríguez-Granger J, et al. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic Streptococcus agalactiae isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; **33**(2): 84-88. [doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.023]
  42. **Turner C**, Turner P, Po L, et al. Group B streptococcal carriage, serotype distribution and antibiotic susceptibilities in pregnant women at the time of delivery in a refugee population on the Thai-Myanmar border. *BMC Infect Dis*. 2012; **12**(1): 34. [doi: 10.1186/1471-2334-12-34]
  43. **Corrêa A**, et al. The Genetic Diversity and Phenotypic Characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro. Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011, **106**(8): 1002-1006. [doi: 10.1590/S0074-02762011000800017]
  44. **Kimura K**, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y. Active screening of group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2013; **66**(2): 158-160. [doi: 10.7883/yoken.66.158]

45. **Elikwu CJ**, Oduyebo O, Ogunsola FT, Anorlu RI, Okoromah CN, König B. High group B streptococcus carriage rates in pregnant women in a tertiary institution in Nigeria. *Pan Afr Med J.* 2016; **25**: 249. [doi:10.11604/pamj.2016.25.249.9433]
46. **Liakopoulos A**, Mavroidi A, Vourli S, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* from vaginal colonization and neonatal infections: A 4-year multicenter study in Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; **78**(4): 487-490. [doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.017]
47. **Fröhlicher S**, Reichen G, Müller M, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: Results from a Swiss tertiary centre. *Swiss Med Wkly.* 2014; **144**(March):1-6. [doi: 10.4414/smw.2014.13935]
48. **García DA**, Mojica ME, Méndez IA, et al. Prevalencia del streptococcus. *agalactiae* en maternas usuarias del Hospital Militar Central, Bogotá (Colombia) año 2010. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2011; **62**(4): 302-307. [doi: 10.18597/rcog.152]



# **CAPÍTULO 2**

## **Artigo Original**

**Caracterização molecular de cepas de *Streptococcus agalactiae*  
isoladas em gestantes do Nordeste do Brasil**

Marta Maria Silva<sup>1</sup>, Fabrícia Almeida Fernandes Santana<sup>1</sup>, Taís Viana Ledo de Oliveira<sup>1</sup>, Lucas Santana Coelho<sup>2</sup>, Cláudio Lima Souza<sup>1</sup>, Fabrício Freire de Melo<sup>1</sup>, Caline Novais Teixeira Oliveira<sup>1</sup>, Márcio Vasconcelos Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brazil.

<sup>2</sup>University of Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brazil.

Multidisciplinary Institute of Health: Rua Hormindo Barros, 58 – Quadra 17 – Lote 58, Bairro Candeias – CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

\*Address correspondence to: Phone: +55 77 3429-2710. E-mail: marciomvof@gmail.com (Márcio Vasconcelos Oliveira)

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B (SGB), são bactérias que podem residir comensalmente nos tratos gastrointestinal e geniturinário de humanos, mas apresentam potencial de desencadear infecções graves, principalmente em neonatos. As doenças invasivas em neonatos podem ser classificadas como de início precoce ou tardio e as manifestações clínicas podem ser sepse, pneumonia e meningite. Dentre os principais fatores de virulência do SGB, o polissacarídeo capsular é indicado como o mais relevante e determina a classificação dos 10 sorotipos conhecidos. Este trabalho representa um recorte de um estudo mais amplo, cujo objetivo foi determinar a prevalência dos sorotipos de 34 cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gestantes colonizadas no município de Vitória da Conquista – BA. Foram utilizadas as técnicas moleculares de sorotipagem, via PCR multiplex e eletroforese em gel. O sorotipo Ia foi o mais prevalente 44,11% (15/34), seguido pelos sorotipos Ib, 26,47% (9/34) e II, 8,82%, (3/34). O sorotipo IX foi o menos prevalente 2,94%, (1/34). Cepas não tipáveis representaram 17,64% (6/34). Cepas dos sorotipos Ia e Ib apresentaram resistência a eritromicina e clindamicina. Este estudo apresentou os primeiros dados de distribuição e prevalência de sorotipos de SGB no município e demonstrou a circulação de cepas dos sorotipos consideradas mais virulentas. Dessa forma, os resultados poderão auxiliar os gestores locais na tomada de decisões para implementação de ações que minorem a transmissão vertical deste microrganismo, corroborando ainda para diminuição de impactos na saúde e na economia do município.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, virulência, sorotipo, PCR.

## ABSTRACT

*Streptococcus agalactiae* or group B streptococci (GBS), are bacteria that can reside commensally in the gastrointestinal and genitourinary tracts of humans, but have the potential to trigger serious infections, especially in neonates. Invasive diseases in neonates can be classified as early or late onset and the clinical manifestations vary from sepsis and pneumonia to meningitis. Among the main virulence factors of GBS, the capsular polysaccharide is indicated as the most relevant, determining the classification of the 10 known serotypes. This work represents an excerpt from a larger study, with the objective of determining the prevalence of serotypes of 34 strains of *Streptococcus agalactiae* isolated from colonized pregnant women in the county of Vitória da Conquista - BA. Molecular serotyping techniques were used, via multiplex PCR and gel electrophoresis. Serotype Ia was the most prevalent 44.11% (15/34), followed by serotypes Ib, 26.47% (9/34) and II, 8.82%, (3/34). Serotype IX was the least prevalent 2.94%, (1/34). Non-typable strains accounted for 17.64% (6/34) of the sample. Strains of serotypes Ia and Ib showed resistance to erythromycin and clindamycin. This study presented the first data on the distribution and prevalence of GBS serotypes in the county and demonstrated the circulation of strains of the serotypes considered to be more virulent. In this way, the results may assist local managers in making decisions to implement actions that reduce the vertical transmission of this microorganism, further corroborating to the reduction of its impacts on the health and economy of the county.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, virulence, serotype, PCR.

## INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B (SGB), são bactérias que compõem a microbiota humana, podendo residir comensalmente nos tratos gastrointestinal e geniturinário<sup>1</sup>. Tem sua importância clínica relacionada ao potencial para desencadear infecções graves, o que a aloca dentro do rol de agentes infecciosos importantes para os humanos, sobretudo nos neonatos. As manifestações clínicas das doenças em neonatos podem incluir sepse, pneumonia, meningite, artrite séptica e bacteremia vinculada à meningite<sup>2,3,4</sup>. A colonização materna por SGB é a causa mais associada à infecção neonatal e risco primário para a transmissão perinatal<sup>5</sup>.

Como ações preventivas para infecção por este agente, o Center for Diseases Control and Prevention (CDC) recomendou o *screening* universal em gestantes entre a entre 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas, apontando padrões para a coleta, transporte da amostra, indicação de antimicrobianos e recomendações profiláticas.

Frente a esta situação, estudos têm sido realizados sobre o SGB, abordando prevalência de colonização em gestantes, resistência aos macrolídeos e prevalência de sorotipos do microrganismo<sup>2,3, 5, 6,7</sup>.

Pesquisas realizadas em Portugal, Coréia, Camarões e Sérvia demonstraram prevalências de 14% a 17,3%<sup>6,7,8,9</sup>. No Brasil, a prevalência variou entre 14,37% a 38,6% no Rio de Janeiro, Santa Catarina, Distrito Federal e Campinas<sup>3,10,11,12</sup>. Já no município de Vitória da Conquista-BA foram apontadas prevalências de 17,4% e 18,1%<sup>13,14</sup>.

Em relação à resistência aos antibióticos, foram documentadas cepas de SGB resistentes ao cloranfenicol, clindamicina e eritromicina<sup>7,10,15,16</sup>. Os mecanismos de resistência à eritromicina e clindamicina estão relacionados à modificação ribossômica codificada pelos genes *erm* (*ermA* e *ermB*), responsável pelo fenótipo MLSB (iMLSB ou cMLSB) e pela bomba de efluxo mediada pelos genes *mef*, responsável pelo fenótipo M<sup>17,18</sup>. A relação a resistência aos antibióticos e sorotipos de SGB tem sido demonstrada na literatura<sup>3,19,20</sup>.

Os sorotipos de SGB são determinados pelo polissacarídeo capsular (CPS) e representa o mais relevante fator de virulência. Dez sorotipos de SGB já foram identificados (Ia, Ib, II-X), sendo o Ia, Ib, II, III e V indicados como os mais infectantes<sup>11</sup>. A compreensão dos diferentes sorotipos possibilita a implementação de medidas profiláticas específicas, indicação de antibióticos adequados e no desenvolvimento de vacinas<sup>10,12,21</sup>. Além do CPS outros fatores de virulência de SGB incluem: proteínas C $\alpha$ , C $\beta$ , proteína de ligação à laminina (LMB), HylB, enzima C5a peptidase e fator CAMP<sup>20,22</sup>.

Frente a este contexto, foi desenvolvido o estudo intitulado “*Streptococcus agalactiae*: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA” do qual o presente escrito constitui uma vertente de investigação. O objetivo deste trabalho foi apontar a prevalência de sorotipos de cepas de SGB isoladas em gestantes colonizadas atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Vitória da Conquista – BA através de técnicas de biologia molecular. Os resultados obtidos poderão auxiliar os gestores locais na tomada de decisões para implementação de ações que minorem a transmissão vertical deste microrganismo, contribuindo para diminuição de impactos na saúde e na economia do município.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento do Estudo e Amostras**

As amostras incluídas neste trabalho foram provenientes da primeira fase do estudo maior que analisou 210 amostras de secreção vaginal/retal de gestantes e houve isolamento de SGB em 18,1% (n=38). Com os dados obtidos na primeira fase do estudo, duas vertentes de investigações distintas foram realizadas de forma exitosa<sup>16,22</sup>. Todos os espécimes de SGB isolados foram aliquotados e congelados em suspensão em meio BHI glicerinado a 20% e depositadas no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS) da UFBA. Compendo a segunda fase do estudo e uma terceira vertente de investigação, na presente

proposta, os espécimes de SGB foram encaminhados para caracterização molecular. Entre as amostras disponíveis, 3 foram inviabilizadas em virtude de contaminação por outros microrganismos e 1 por não apresentar crescimento em meio de cultivo. Ao final, 34 amostras foram analisadas.

### **Processamento das amostras**

Todas as amostras foram descongelados à temperatura ambiente, homogeneizadas e em seguida um volume de 10 µl do conteúdo de cada eppendorf foi transferido para tubos de ensaio contendo 9 ml do meio seletivo Tood-Hewitt BIOMERIEUX® (figura 1), em seguida foram incubados por 24 horas uma temperatura de 35-37°C. Após esta etapa, realizou-se repique para meio cromogênico *CHROMagar™ Orientation*, utilizando técnica de semeadura por esgotamento com alça de platina, sendo em seguida incubados por 24 horas em temperatura de 35-37°C. Após período de incubação, seguindo as orientações do fabricante, todas as colônias de cor azul claro foram certificadas como colônias de SGB (figura 2). Para as amostras que não cresceram puras em ágar cromogênico (figura 3) realizou-se repique das colônias azul claro em ágar chocolate e foram incubadas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C por 24 horas (figura 5). Em seguida realizou-se a sorogrupagem para confirmação da espécie, utilizando o *Kit SLIDEX® Strepto Plus B* (BIOMERIEUX). Para as amostras cujo crescimento não apresentou nenhuma colônia sugestiva de SGB em meio cromogênico (figura 5) ainda assim, para as colônias azuis, independente das tonalidades, foram repicadas em ágar chocolate e incubadas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C por 24 horas. Em seguida, realizou-se a sorogrupagem para inclusão ou exclusão da amostra. Uma vez realizada a etapa de crescimento em meio de cultivo, 34 amostras foram certificadas como SBG e encaminhadas para determinação de sorotipos. O fluxograma dos procedimentos está ilustrado na figura 6.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex**

O DNA das amostras foi extraído pelo método de fervura conforme descrito por FAN e colaboradores<sup>23</sup>. Após a extração do DNA, foi realizada a PCR

multiplex, seguindo o protocolo de Imperi e colaboradores<sup>24</sup>. Com o volume final de 25 µl, a mistura da PCR continha: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 250 nM de cada primer direto e reverso, tampão de Taq polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,3 U de Taq DNA polimerase e 5 µl do DNA molde. As amplificações foram realizadas em um termociclador programado da seguinte forma: desnaturação por 5 minutos a 95° C, seguido de 15 ciclos de 95°C durante 60 segundos, 54°C durante 60 segundos e 72°C por 2 minutos e depois por 25 ciclos adicionais de 95°C por 60 segundos, 56° C por 60 segundos e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplifica o pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose.

### **Eletroforese em gel de agarose**

Para essa etapa, utilizou-se cuba de eletroforese com gel de agarose a 2% em TAE (Tris,  cido acético e EDTA) 1X. O gel foi corado com brometo de etídeo e após corrida eletroforética foi visualizado no transiluminador UV (L-PIX, Loccus Biotecnologia). Cada sorotipo foi identificado pela análise do padrão de duas ou três bandas observadas no gel para isso utilizou-se marcador de peso molecular na escala de 100 bp Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific).

### **Resistência aos antibióticos e Sorotipos de SGB**

Os fenótipos de resistência (cMLSB, iMLSB e Fenótipo M) para as cepas de SGB resistentes à eritromicina e/ou clindamicina e a determina o dos genes de resistência à eritromicina (*ermB*, *ermTR* e *mefA*) e clindamicina (*linB*) foram analisados por Santana e colaboradores<sup>16</sup> na primeira fase do estudo maior. Essas informa es foram utilizadas no presente estudo a fim de relacionar o perfil de resistência aos sorotipos circulantes encontrados.

### **Análises estatísticas**

Face à natureza do estudo, foi realizada análise meramente descritiva das variáveis com o banco de dados constituído em *Microsoft Excel*.



## Considerações Éticas

O projeto ao qual esse estudo está vinculado obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia, mediante o número de registro CAAE 58104116.8.0000.5556, sob parecer de número 1.736.058.

## RESULTADOS

Das 34 amostras analisadas, foi possível identificar os sorotipos em 28 (82,35%). A figura 7 apresenta alguns resultados dos produtos de amplificação da PCR multiplex, obtidos através da eletroforese em gel de agarose 2%.

O sorotipo Ia foi o mais prevalente representando 44,11% das amostras (15/34) e o sorotipo IX foi o menos prevalente (2,94%, 1/34). Não foram detectados os sorotipos III, IV, V, VI, VII e VIII. Em 6 amostras (17,64%) não foi possível identificar os sorotipos e, estas foram consideradas como não tipáveis. A figura 8 detalha a prevalência dos sorotipos encontrados nesse estudo.

Em relação à resistência a antibióticos, cumpre ressaltar que utilizando as mesmas cepas de SGB aqui analisadas, Santana<sup>25</sup> observou resistência à clindamicina em 18,8% destas e resistência à eritromicina em 25%, tendo sido identificados genes *mef* e da família *erm*. Na presente investigação, os sorotipos mostraram relação com a resistência antimicrobiana previamente encontrada. A tabela 1 demonstra esses achados.

## DISCUSSÃO

Neste estudo foram detectados os sorotipos Ia, Ib, II e IX. O sorotipo Ia foi o mais prevalente correspondendo a 44,11% das cepas. Este resultado está de acordo com estudos brasileiros conduzidos em São Paulo, Distrito Federal, Rio de Janeiro e Santa Catarina onde o sorotipo Ia também foi mais detectado<sup>3,10,11,12,26</sup>. Corrobora

ainda com esse achado, os resultados de estudos realizados na Argentina, África do Sul, Quênia e Nigéria onde o sorotipo Ia também foi o mais prevalente<sup>20,27,28,29,30</sup>.

Segundo Botelho e colaboradores<sup>10</sup> o sorotipo Ia é indicado como o mais frequente entre os isolados recuperados de casos de colonização ou infecções em indivíduos de várias idades. Esse sorotipo também foi considerado o mais prevalente em doença materna nos Estados Unidos, Reino Unido e França e, o que mais contribui para a doença de início precoce em neonatos<sup>2</sup>. Na mesma direção, Lo e colaboradores<sup>31</sup> observaram que o sorotipo Ia foi responsável pela maioria dos casos de doença de início precoce em neonatos de Taiwan.

Na China, Zhu e colaboradores<sup>32</sup> demonstraram entre as características clínicas de neonatos infectados com o sorotipo Ia a existência de febre, desconforto respiratório, convulsão, pneumonia, sepse, meningite purulenta e choque séptico, com taxa de mortalidade de 28,57%. Lo e colaboradores<sup>31</sup> e Nascimento<sup>19</sup>; apontam que os fatores de virulência desse sorotipo ainda não são totalmente compreendidos, sendo necessários mais estudos para esclarecimentos.

Nesse estudo, o sorotipo Ib foi o segundo mais prevalente (26,47%), divergindo de resultados encontrados em outros estudos nacionais que apresentaram uma variação menor na prevalência, alternando entre 1,5% a 18,7%<sup>11,33</sup>. Alguns estudos tem apontado o sorotipo Ib apenas como colonizadores em gestantes, sem relação com casos de doença neonatal<sup>28,34</sup>. Por outro lado, esse sorotipo já foi observado ocasionando doenças em neonatos<sup>35,36</sup>. Kao e colaboradores<sup>37</sup> observaram que neonatos com doenças pelo sorotipo Ib apresentaram manifestações clínicas mais graves quando comparado a outros sorotipos e taxa de mortalidade de 33,3%.

Identificado em 8,82% das amostras, o sorotipo II foi o terceiro mais prevalente no presente estudo, concordando com uma prevalência mais reduzida como relatado em estudos nacionais realizados em São Paulo (7%) e Santa Catarina (1,5%)<sup>11,12</sup>. Por outro lado, divergindo desse achado, na Etiópia, esse tipo capsular foi o mais prevalente, representando 41,5% a 68,8% das cepas<sup>38,39</sup>.

Neste estudo apenas uma cepa sorotipo IX (2,94%) foi identificada e está de acordo com os resultados obtidos em estudos realizados em Londrina e São Paulo,

onde esse sorotipo também foi um dos menos prevalente, variando entre 1,2% e 2,27%<sup>19,26</sup>. Esse achado também apresentou semelhança com os de outros países como Noruega (2,68%), Marrocos (3%), Espanha (3,2%) e Argentina (4%) que demonstraram menor frequência do IX<sup>20,40,41,42</sup>. Descrito em 2007 por Slotved e colaboradores<sup>43</sup>, trata-se do sorotipo mais recente e foi proposto que pode ter evoluído como resultado de mutação e/ou recombinação entre os sorotipos Ib, V e/ou IV. Em contraste, estudo realizado em Gana foi detectado como o segundo mais dominante, chegando a 32,1% dos isolados<sup>44</sup>. De acordo com Takahara e colaboradores<sup>45</sup> há pouco conhecimento sobre as características clínicas, espectro e prognósticos da infecção por esse sorotipo. Segundo Feuerschuette<sup>11</sup> esse sorotipo é considerado um dos menos virulentos e de menor importância clínica, mas poucos estudos investigaram sua epidemiologia e prevalência.

Conforme Bobadilla e colaboradores<sup>27</sup>, a gravidade da doença neonatal é determinada pelo sorotipo capsular e também por fatores de virulência como as proteínas de superfície C $\alpha$ , Rib, proteína de ligação à laminina (*Imb*), HylB, enzima C5a peptidase e fator CAMP. Analisando amostras vaginal/retal de gestantes argentinas, os autores identificaram como mais prevalentes os sorotipos Ia, Ib, II e III e a análise de 9 genes de virulência apontou a associação entre sorotipos e genes *bac*, *cyIB*, *rib* e *Imb*, indicando que esses genes não apresentam distribuição uniforme entre os sorotipos. No Brasil, Nascimento<sup>19</sup> verificou que genes de virulência foram encontrados entre os sorotipos mais comuns (Ia, Ib, II, III e V), considerando-os como potencialmente patogênicos. No presente estudo não foram investigados genes associados à virulência. Salienta-se a necessidade de realização de estudos com estudo futuro, tendo como foco essa abordagem, para maior compreensão dos mecanismos de agressão do SGB. Cumpre ressaltar que 79,4% das cepas circulantes no município refere-se aos sorotipos Ia e Ib, estando incluídos entre os já descritos como mais virulentos.

Para 6 isolados analisados nesse estudo não foi possível determinar o sorotipo capsular (17,64%). Cepas não tipáveis (NT) já foram registrados em estudos nacionais com ocorrência de 12,1% a 27,45%, no Rio de Janeiro e 6,82% em São Paulo<sup>10,19,46</sup>. Segundo Furfaro e colaboradores<sup>2</sup> são considerados NT os isolados que não representam nenhum dos sorotipos definidos. Segundo esses autores não é possível afirmar se tal resultado é proveniente da especificidade da técnica utilizada

ou se tais isolados constituem novos sorotipos. Por outro lado, a perda do *locus* capsular, conforme observado por Creti e colaboradores<sup>47</sup>, e a perda de expressão da cápsula em SBG, promovida por mutações que inativavam a síntese da cápsula ou que levam a códons de parada nos genes *cps*, foram indicados como possibilidades de contribuição significativa para a inclusão de cepas na categoria não tipificável<sup>48</sup>.

Cepas não tipáveis também foram encontradas no Canadá. Os pesquisadores encontraram seis cepas NT (5,8%) e conseguiram identificar, através do sequenciamento completo do genoma (WGS), mutações em um ou mais genes do loci *cps*, além de mutações pontuais e inserções/deleções que resultaram na abolição da expressão da cápsula<sup>49</sup>. Em outros países como Japão, a prevalência de cepas NT foi de 22%; na Itália 16,3%; na China 2,7%; na Austrália 2,5% e; na Espanha 0,6%<sup>41,50,51,52,53</sup>. Ressalta-se que existe uma perspectiva futura de realização de sequenciamento das cepas analisadas no presente estudo como finalização do estudo maior ao qual este escrito encontra-se relacionado.

Embora os demais sorotipos não tenham sido identificados, já foram documentados em estudos com gestantes brasileiras de outras regiões. Para o III já foram detectadas prevalência variando entre 6,8% a 39,39%; IV 1,7% a 3,7%; V 9,1% a 20%; VI 4%; VII e VIII 0,7%.<sup>10,11,12,46,54</sup>. Em outros países como China, por exemplo, estudos apresentaram o III como o sorotipo mais frequentemente identificado em gestantes<sup>52</sup> e em doenças invasivas em neonatos com sepse e pneumonia, para os casos de doença de início precoce e meningite purulenta para as de início tardio<sup>55</sup>. Uma revisão sistemática demonstrou que na América do Sul e Sudeste Asiático houve prevalência mais baixa deste sorotipo nas gestantes<sup>56</sup>.

Diversas investigações têm demonstrado que os sorotipos mais prevalentes e mais infectantes correspondem aos sorotipos Ia, Ib, II-V e estão envolvidos em doenças, correspondendo à maioria dos casos em todo o mundo<sup>34,57</sup>. Os sorotipos VI – IX são mais comuns na Ásia<sup>56,58</sup>. Em Taiwan, o sorotipo VI foi o principal em neonatos com doenças de início precoce e em gestantes colonizadas, emergindo como um importante patógeno invasivo<sup>36</sup>. Na Coreia do Sul, o sorotipo mais comum foi o III, seguido pelo V, Ia, Ib e VI<sup>35</sup>.

No Brasil, na cidade de Campinas (SP), Fiolo e colaboradores<sup>59</sup> analisaram amostras provenientes de sangue e líquido de neonatos com sepse neonatal precoce,

meningite associada a sepse precoce e infecção tardia (conjuntivite purulenta, sepse e pneumonia). Nesse estudo, foram identificados os sorotipos Ia, III e V.

Evangelista e Freitas<sup>60</sup> descreveram casos de neonatos internados, por SGB, internados em unidade pública de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) de Brasília apresentando dificuldade respiratória e sepse por SGB. A taxa de mortalidade foi de 62,5%, e nenhuma das mães havia sido rastreada para SGB, embora houvesse um bom número de consultas pré-natais. Dois anos após a realização deste estudo, Freitas e Romero<sup>61</sup> realizaram uma nova investigação para comparar o anterior após a implementação da profilaxia antibiótica intraparto e identificaram a inexistência de casos de infecção ocasionada por SGB em neonatos.

Além do rastreio e profilaxia, Metcalf e colaboradores<sup>62</sup> apontam que a caracterização dos sorotipos capsulares e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana são os dois parâmetros mais relevantes da vigilância do SGB, pois permitem avaliar a distribuição dos sorotipos e o perfil de sensibilidade, auxiliando na orientação do tratamento e na prevenção de doenças por este agente. A penicilina permanece eficaz e sendo a primeira linha para tratamento de infecções pelo SGB e embora já tenham sido relatada sensibilidade reduzida a este fármaco, menos de 1% das cepas são consideradas resistentes. Fazendo uso de teste fenotípico, Santana<sup>25</sup> observou apenas 1 isolado de SGB resistente à penicilina (3,1%), mas reiterou a necessidade de confirmação desse achado mediante estudo genotípico. Cepas resistentes à penicilina já foram identificados como sendo dos sorotipos Ia, III e V<sup>34,38,63</sup>.

No presente estudo foi verificado que as cepas resistentes à clindamicina e eritromicina, antibióticos alternativos para pacientes alérgicos à penicilina, pertenciam aos sorotipos Ia e Ib. As cepas do sorotipo Ia carregavam o gene *mefA*, mas também foi observada uma cepa apresentando concomitantemente os genes *mefA* e *ermB*. O gene *ermB* foi encontrado em uma cepa do sorotipo Ib. Estudos brasileiros já identificaram a resistência à clindamicina e/ou eritromicina em isolados dos sorotipos Ia, Ib, II, III, V, VIII e IX<sup>3,11,19</sup>. No cenário internacional, Nabavinia e colaboradores<sup>64</sup> identificaram que cepas do sorotipo III eram resistentes à eritromicina e cepas dos sorotipos Ia e II eram resistentes à clindamicina. Os autores apresentaram uma correlação entre o gene *ermB* e os sorotipos Ia, Ib, II, III e V. Mohamed e colaboradores<sup>65</sup> verificaram que a resistência à eritromicina e clindamicina foi restrita

aos sorotipos Ia, III e V entre os isolados de gestantes. Todos esses dados apontam para a necessidade de vigilância contínua quanto à resistência aos antibióticos a fim de que sejam tomadas medidas acertadas na escolha da antibioticoterapia.

Uma revisão sistemática e meta-análise realizada por Edmond e colaboradores<sup>66</sup> demonstrou que o SGB permanecia como uma das principais causas de morbimortalidade em neonatos na Europa, Américas e Austrália. Genovese e colaboradores<sup>51</sup> consideraram que, anualmente, o SGB é responsável por 114.000 a 204.000 casos invasivos e 147.000 natimortos e mortes infantis mundialmente. López e colaboradores<sup>15</sup> reforçam que a carga real de infecções por SGB em neonatos é, provavelmente, subestimada, pois alguns casos não são diagnosticados adequadamente.

Dutra e colaboradores<sup>33</sup> ressaltaram que mesmo com o impacto clínico e epidemiológico das infecções por SGB, os dados dos isolados no Brasil são fragmentados e representativos de apenas algumas áreas. Battistin e colaboradores<sup>67</sup> complementaram que os dados brasileiros não são bem conhecidos em virtude da ausência de um programa de vigilância específico para controle e registro dos casos, principalmente considerando os contextos locais. Destaca-se que o monitoramento contínuo, inclusive da prevalência de sorotipos, é essencial para orientar estratégias de prevenção eficazes<sup>36</sup>.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo apresenta os primeiros dados de distribuição e prevalência e distribuição de sorotipos de SGB no município de Vitória da Conquista-BA. Os achados foram concordantes com relatos brasileiros e internacionais. Os resultados do presente estudo chama atenção por demonstrar a circulação de 3 dos 5 sorotipos de SGB considerados como mais virulentos e responsáveis por complicações em gestantes e doenças invasivas em neonatos (Ia, Ib e II). Considera-se genericamente que 1-2% dos neonatos nascidos de mães colonizadas pelo SGB desenvolvem doenças de início precoce. Entretanto, conforme identificado no presente estudo, 79,4% das cepas circulantes na região fazem parte das que apresentam maior

potencial invasivo. Dessa forma, existe a possibilidade desse percentual ser maior e um número considerável de neonatos desenvolverem a doença. Além disso, essa estimativa não inclui os casos de doenças de início tardio pelo SGB que os sorotipos identificados apresentam capacidade de desencadear.

Considerando que a doença neonatal precoce implica no aumento do número de dias de internação, de leitos de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) ocupados e dos gastos com insumos e materiais, é possível considerar que os gastos com a política de rastreamento seja muito significativo<sup>68</sup>. No Brasil, faltam estimativas confiáveis sobre gastos com tratamento de neonatos infectados pelo SGB e dos tratamentos de suas sequelas<sup>69</sup>. Santana<sup>25</sup> estimou que rastrear todas as gestantes do município de Vitória da Conquista-BA, por um período de um ano, geraria um custo muito inferior ao necessário para a manutenção dos neonatos na UTI. Dessa forma, é de grande relevância que os gestores locais avaliem a implementação de um programa de rastreio para SGB em gestante com vistas a evitar a morbimortalidade neonatal, bem como para melhor disponibilização de leito neonatal para causas não evitáveis e diminuição de custos em saúde, além de preservar vidas e saúde materno-fetal.

Os resultados desse trabalho soma-se aos já publicados por Santana e colaboradores<sup>16</sup> e Oliveira e colaboradores<sup>14</sup> em delineamento voltado à investigação e proposição de estratégias de enfrentamento ao SGB no município, fornecendo achados importantes relacionados ao microrganismo e doença, subsidiando a implementação de estratégias de rastreio, vigilância dos sorotipos circulantes e adoção de medidas de prevenção eficazes frente ao SGB.

## REFERÊNCIAS

1. **Koneman E**; et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
2. **Furfaro LL**, Chang BJ, Payne MS. Perinatal streptococcus agalactiae epidemiology and surveillance targets. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):1-18. [doi:10.1128/CMR.00049-18]
3. **Siqueira F**. Colonização de pacientes grávidas por *Streptococcus agalactiae* em Taguatinga Distrito Federal, Brasil. 2017. Available at: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/148701>.
4. **Edwards MS**, Baker CJ. *Streptococcus Agalactiae (Group B Streptococcus)*. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2018. [doi:10.1016/B978-0-323-40181-4.00119-5]
5. **Li S**, Wen G, Cao X, et al. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* in a mother-baby prospective cohort study: Implication for vaccine development and insights into vertical transmission. *Vaccine.* 2018;36(15):1941-1948. [doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.109]
6. **Torres, SIF**. *Streptococcus agalactiae*, avaliação da resistência a macrólidos .84f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2012
7. **Lee HT**, Kim SY, Park PW, et al. Detection and genomic analysis of genital group B streptococcus in pregnant Korean women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019; 45(1): 69-77. [doi: 10.1111/jog.13810]
8. **Nkembe NM**, Kamga HG, Baiye WA, Chafa AB, Njotang PN. *Streptococcus agalactiae* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern in vaginal and anorectal swabs of pregnant women at a tertiary hospital in Cameroon. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):10-15. [doi:10.1186/s13104-018-3589-x]
9. **Gajic I**, Plainvert C, Kekic D, et al. Molecular epidemiology of invasive and non-invasive group B *Streptococcus* circulating in Serbia. *Int J Med Microbiol.* 2019;309(1):19-25. [doi:10.1016/j.ijmm.2018.10.005]
10. **Botelho ACN**, Oliveira JG, Damasco AP, et al. *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *PLoS One.* 2018; 13(5): 1-12. [doi: 10.1371/journal.pone.0196925]
11. **Feuerschuette OHM**. – Diversidade genética e características fenotípicas do estreptococo do grupo B do trato anogenital de gestantes. Tese (Doutorado EM Ciências da Saúde) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
12. **Andrade PD**, Russo J de S, Gouveia JB, et al. Molecular Characterization of Group B *Streptococcus* Serotypes By Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Med Express.* 2017; 4(4). [doi: 10.5935/medicalexpress.2017.04.06]



13. **Oliveira MV**, Teles MF, Viana TA. Prevalência e fatores de risco associados à colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas no Hospital Municipal Esaú matos em Vitória da Conquista–BA. *C&D-Revista Eletrônica da Fainor*. 2013; 6(1): 172–184.
14. **Oliveira TVL**, Santana FAF, Oliveira CNT, Santos MLC, de Melo FF, Souza CL, Oliveira MV. *Streptococcus agalactiae*: Sensitivity profile in pregnant women attending health units in northeastern Brazil. *World J Obstet Gynecol* 2020; 9(1): 11-17 [DOI: 10.5317/wjog.v9.i1.11].
15. **López Y**, Parra E, Cepas V, et al. Serotype, virulence profile, antimicrobial resistance and macrolide-resistance determinants in *Streptococcus agalactiae* isolates in pregnant women and neonates in Catalonia, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018; 36(8):472-477. [doi: 10.1016/j.eimc.2017.08.006]
16. **Santana FAF**, de Oliveira TVL, Filho MB de S, et al. *Streptococcus agalactiae*: Identification methods, antimicrobial susceptibility, and resistance genes in pregnant women. *World J Clin Cases*. 2020; 8(18):3988-3998. [doi:10.12998/wjcc.v8.i18.3988]
17. **Shabayek S**, Abdalla S. Macrolide- and tetracycline-resistance determinants of colonizing group B streptococcus in women in Egypt. *J Med Microbiol*. 2014;63:1324-1327. [doi:10.1099/jmm.0.077057-0]
18. **Bolukaoto JY**, et al. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Res Notes*. 2015; 8: 364 [PMID: 26289147 DOI: 10.1186/s13104-015-1328-0]
19. **Nascimento, CS**. *Streptococcus agalactiae* -Distribuição sorotípica e relação com fatores de virulência e resistência antimicrobiana. 2019. 67f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
20. **Oviedo P**, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Streptococcus agalactiae* in Pregnant Women. First Study in a Province of Argentina.2013; *Brazilian J Microbiol* 44 (1): 253-258.
21. **Khatami A**, Randis TM, Tavares L, Gegick M, Suzman E, Ratner AJ. Vaginal co-colonization with multiple Group B *Streptococcus* serotypes. *Vaccine*. 2019;37(3):409-411. doi:10.1016/j.vaccine.2018.12.001
22. **Nagao PE**. *Streptococcus Agalactiae (Group B Streptococci)*. Vol 3. Elsevier Ltd; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00099-8
23. **Fan HH**, Kleven SH, Jackwood MW. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* 1995; 39: 729-735 [PMID: 8719206]

24. **Imperi M**, Pataracchia M, Alfaroni G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods*. 2010; 80(2):212-214. [doi:10.1016/j.mimet.2009.11.010]
25. **Santana FAF**. Comparação de metodologias de identificação, perfil de susceptibilidade antimicrobiana e determinação de genes de resistência em cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gestantes de Vitória da Conquista–BA. 94 p. Biociências, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018
26. **Otaguiri ES**, Morguette AEB, Tavares ER, et al. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: Capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiol*. 2013;13(1). [doi:10.1186/1471-2180-13-297]
27. **Bobadilla FJ**, Novosak MG, Cortese IJ, Delgado OD, Laczeski ME. Prevalence, serotypes and virulence genes of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women with 35–37 weeks of gestation. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1-11. doi:10.1186/s12879-020-05603-5
28. **Said M**, Dangor Y, Mbelle N, Madhi SA, Kwatra G, Ismail F. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus agalactiae* rectovaginal colonising isolates from pregnant women at a tertiary hospital in Pretoria, South Africa: An observational descriptive study. *South African Med J*. 2020;110(9):869-871. [doi:10.7196/SAMJ.2020.v110i9.14524]
29. **Jisuvei SC**, Osoi A, Njeri MA. Prevalence, antimicrobial susceptibility patterns, serotypes and risk factors for group B streptococcus rectovaginal isolates among pregnant women at Kenyatta National Hospital, Kenya; A cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-9. [doi:10.1186/s12879-020-05035-1]
30. **Elikwu CJ**, Oduyebo O, Ogunsola FT, Anorlu RI, Okoromah CN, König B. High group B streptococcus carriage rates in pregnant women in a tertiary institution in Nigeria. *Pan Afr Med J*. 2016; 25: 249. [doi: 10.11604/pamj.2016.25.249.9433]
31. **Lo CW**, Liu HC, Lee CC, et al. Serotype distribution and clinical correlation of *Streptococcus agalactiae* causing invasive disease in infants and children in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019; 52(4):578-584. [doi:10.1016/j.jmii.2017.09.002]
32. **Zhu Y**, Wu J, Zheng X, et al. Etiological serotype and genotype distributions and clinical characteristics of group B streptococcus-inducing invasive disease among infants in South China. *BMC Pediatr*. 2020;20(1):1-8. [doi:10.1186/s12887-020-02048-2]
33. **Dutra VG**, Alves VM, Olendzki AN, Dias CA, de Bastos AF, Santos GO, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and

antimicrobial susceptibility. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 323 [PMID: 24919844 DOI: 10.1186/1471-2334-14-323]

34. **Burcham LR**, Spencer BL, Keeler LR, et al. Determinants of Group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. *PLoS One*. 2019; 14(12): 1-16. [doi: 10.1371/journal.pone.0226699]

35. **Yoon IA**, Jo DS, Cho EY, Choi EH, Lee HJ, Lee H. Clinical significance of serotype V among infants with invasive group B streptococcal infections in South Korea. *Int J Infect Dis*. 2015;38:136-140. [doi:10.1016/j.ijid.2015.05.017]

36. **Lin HC**, Chen CJ, Chiang KH, et al. Clonal dissemination of invasive and colonizing clonal complex 1 of serotype VI group B Streptococcus in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016; 49(6): 902-909. [doi: 10.1016/j.jmii.2014.11.002]

37. **Kao Y**, Tsai MH, Lai MY, et al. Emerging serotype III sequence type 17 group B streptococcus invasive infection in infants: The clinical characteristics and impacts on outcomes. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1-8. [doi:10.1186/s12879-019-4177-y]

38. **Ali MM**, Woldeamanuel Y, Asrat D, et al. Features of Streptococcus agalactiae strains recovered from pregnant women and newborns attending different hospitals in Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-9. [doi:10.1186/s12879-020-05581-8]

39. **Gizachew M**, Tiruneh M, Moges F, Adefris M, Tigabu Z, Tessema B. Molecular characterization of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women and newborns at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-9. [doi:10.1186/s12879-020-4776-7]

40. **Brigtsen AK**, Dedi L, Melby KK, et al. Comparison of PCR and serotyping of Group B Streptococcus in pregnant women: The Oslo GBS-study. *J Microbiol Methods*. 2015; 108: 31-35. [doi: 10.1016/j.mimet.2014.11.001]

41. **Liébana-Martos MDC**, Cabrera-Alavargonzalez J, Rodríguez-Granger J, et al. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic Streptococcus agalactiae isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33(2): 84-88. [doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.023]

42. **Moraleda C**, Benmessaoud R, Esteban J, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of group B streptococcus isolated among pregnant women and newborns in Rabat, Morocco. *J Med Microbiol*. 2018;67(5):652-661. [doi:10.1099/jmm.0.000720]

43. **Slotved HC**, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a proposed new Streptococcus agalactiae serotype. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2929-2936. [doi:10.1128/JCM.00117-07]

44. **Slotved HC**, Dayie NTKD, Banini JAN, Frimodt-Møller N. Carriage and serotype distribution of Streptococcus agalactiae in third trimester pregnancy in southern

Ghana. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2017;17(1). doi:10.1186/s12884-017-1419-0

45. **Takahara T**, Matsubara K, Maihara T, Yamagami Y, Chang B. Ultra-late-onset meningitis caused by serotype IX group B streptococcus. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(7):801. [doi:10.1097/INF.0000000000000732]

46. **Corrêa A**, et al. The Genetic Diversity and Phenotypic Characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011, 106(8): 1002-1006. [doi: 10.1590/S0074-02762011000800017]

47. **Creti R**, Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Recchia S, Baldassarri L. Identification and molecular characterization of a *S. agalactiae* strain lacking the capsular locus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(3):233-235. [doi:10.1007/s10096-011-1298-7]

48. **Rosini R**, Campisi E, De Chiara M, et al. Genomic analysis reveals the molecular basis for capsule loss in the group B *Streptococcus* population. *PLoS One*. 2015;10(5):1-20. [doi:10.1371/journal.pone.0125985]

49. **Teatero S**, et al. Diseases Serotype Distribution, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Group B *Streptococcus* Strains Recovered from Colonized Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55(2): 412- 422.

50. **Kimura K**, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y. Active screening of group B *Streptococci* with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2013; 66(2): 158-160. [doi: 10.7883/yoken.66.158]

51. **Genovese C**, D'Angeli F, Di Salvatore V, Tempera G, Nicolosi D. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(12):2387-2396. [doi:10.1007/s10096-020-03992-8]

52. **Cheng Z**, Qu P, Ke P, et al. Antibiotic Resistance and Molecular Epidemiological Characteristics of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Pregnant Women in Guangzhou, South China. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020;2020. [doi:10.1155/2020/1368942]

53. **Furfaro LL**, Nathan EA, Chang BJ, Payne MS. Group B streptococcus prevalence, serotype distribution and colonization dynamics in Western Australian pregnant women. *J Med Microbiol*. 2019;68(5):728-740. [doi:10.1099/jmm.0.000980]

54. **Soares GCT**, Alviano DS, Santos G da S, Alviano CS, Mattos-Guaraldi AL, Nagao PE. Prevalence of group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2013; 44(3):869-872. [doi: 10.1590/S1517-83822013000300032]

55. **Liu J**, Xu R, Zhong H, et al. Prevalence of GBS serotype III and identification of a ST 17-like genotype from neonates with invasive diseases in Guangzhou, China.

*Microb Pathog.* 2018;120:213-218. doi:10.1016/j.micpath.2018.05.002

56. **Madrid L**, Seale AC, Kohli-Lynch M, et al. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis.* 2017;65(Suppl 2):S160-S172. [doi:10.1093/cid/cix656]

57. **Mukesi M**, Iweriebor BC, Obi LC, Nwodo UU, Moyo SR, Okoh AI. Prevalence and capsular type distribution of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Namibia and South Africa. *BMC Infect Dis.* 2019; 19(1). [doi:10.1186/s12879-019-3809-6]

58. **Russell NJ**, Seale AC, O'Driscoll M, et al. Maternal Colonization with Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis.* 2017;65(Suppl 2):S100-S111. doi:10.1093/cid/cix658

59. **FILOLO, K.** Identificação dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas em pacientes colonizados e infectados na cidade de Campinas e região – Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, 2011

60. **Evangelista MLB**, de Mello Freitas FT. Group B streptococcus neonatal infection in an intensive care unit in Brazil: High fatality and missed opportunities for antibiotic prophylaxis. *Brazilian J Infect Dis.* 2015;19(1):98-99. [doi:10.1016/j.bjid.2014.06.007]

61. **Freitas FT de M**, Romero GAS. Early-onset neonatal sepsis and the implementation of group B streptococcus prophylaxis in a Brazilian maternity hospital: a descriptive study. *Brazilian J Infect Dis.* 2017;21(1):92-97. [doi:10.1016/j.bjid.2016.09.013]

62. **Metcalf BJ**, Chochua S, Gertz RE, et al. Short-read whole genome sequencing for determination of antimicrobial resistance mechanisms and capsular serotypes of current invasive *Streptococcus agalactiae* recovered in the USA. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(8):574.e7-574.e14. doi:10.1016/j.cmi.2017.02.021

63. **Melin P.** Neonatal group B streptococcal disease: From pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(9):1294-1303. [doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03576.x]

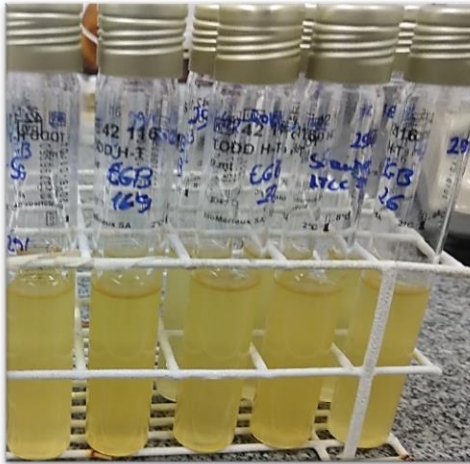
64. **Nabavinia M**, Khalili MB, Sadeh M, et al. Distribution of pilus island and antibiotic resistance genes in streptococcus agalactiae obtained from vagina of pregnant women in Yazd, Iran. *Iran J Microbiol.* 2020;12(5):411-416. doi:10.18502/ijm.v12i5.4601

65. **Mohamed AM**, Khan MA, Faiz A, et al. Group B Streptococcus colonization, antibiotic susceptibility, and serotype distribution among Saudi pregnant women. *Infect Chemother.* 2020;52(1):70-81. [doi:10.3947/ic.2020.52.1.70]

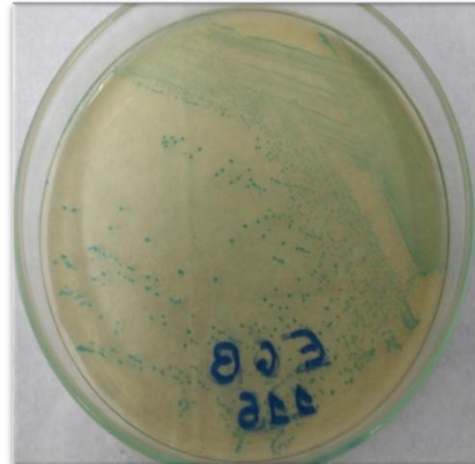
66. **Edmond KM**, Kortsalioudaki C, Scott S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: Systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2012;379(9815):547-556. doi:10.1016/S0140-6736(11)61651-6

67. **Battistin FR**, Mott, MP, Dias, CAG e Perez. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women at a maternity hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Scientia Medica*, 28 (3), 2018, ID30246. [doi.org/10.15448/1980-6108.2018.3.30246]
68. **Baker CJ**. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. *Vaccine*. 2013;31(S4):D3-D6. [doi:10.1016/j.vaccine.2013.02.030]
69. **Dias JF**. Colonização por estreptococo do grupo B em gestantes Cuiabá. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2014.

## MATERIAL SUPLEMENTAR



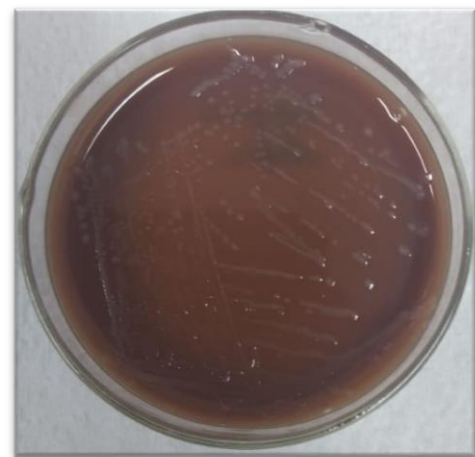
**Figura 1-** Amostras de SGB incubadas em Todd-Hewitt.



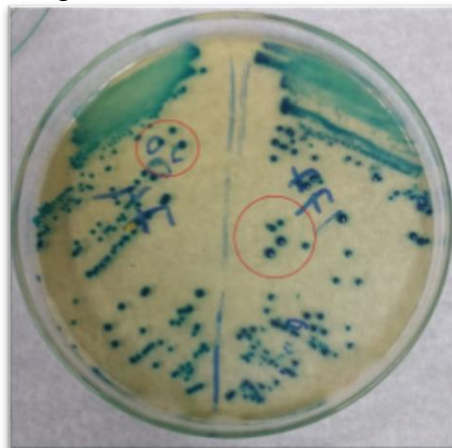
**Figura 2** –Colônias de SGB em ágar cromogênico.



**Figura 3-** Colônias de SGB (azul claro) e colônias sugestivas de *Enterococcus* ssp. (azul turquesa) em ágar cromogênico.



**Figura 4-** Colônias de SGB em ágar chocolate.



**Figura 5-** Colônias sugestivas de *Enterococcus* ssp. em ágar cromogênico.

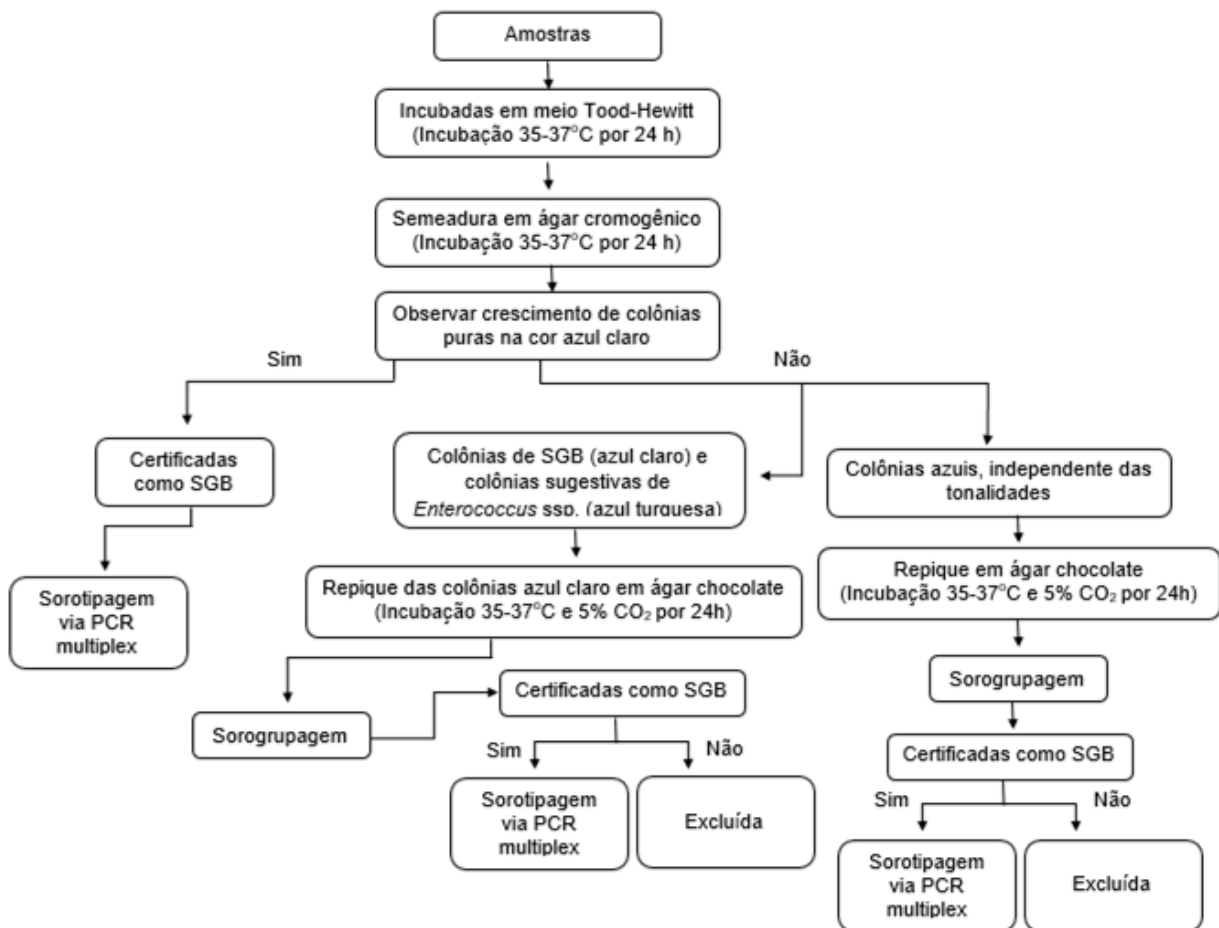


Figura 6 – Fluxograma de procedimentos

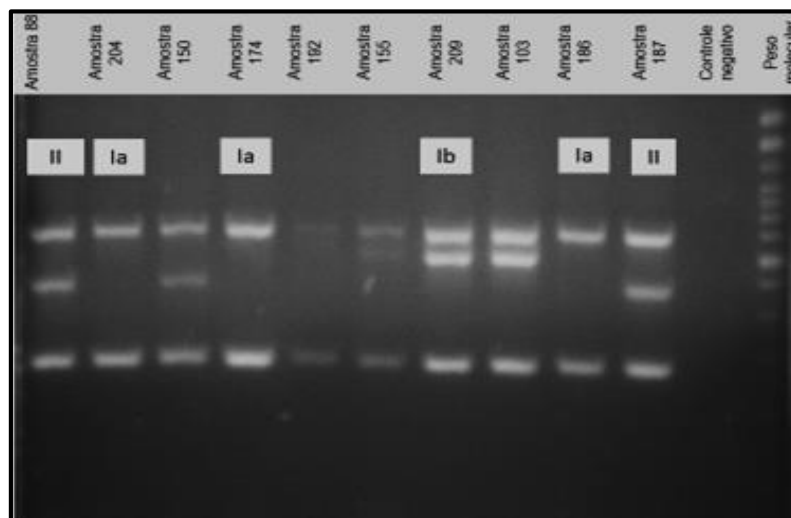
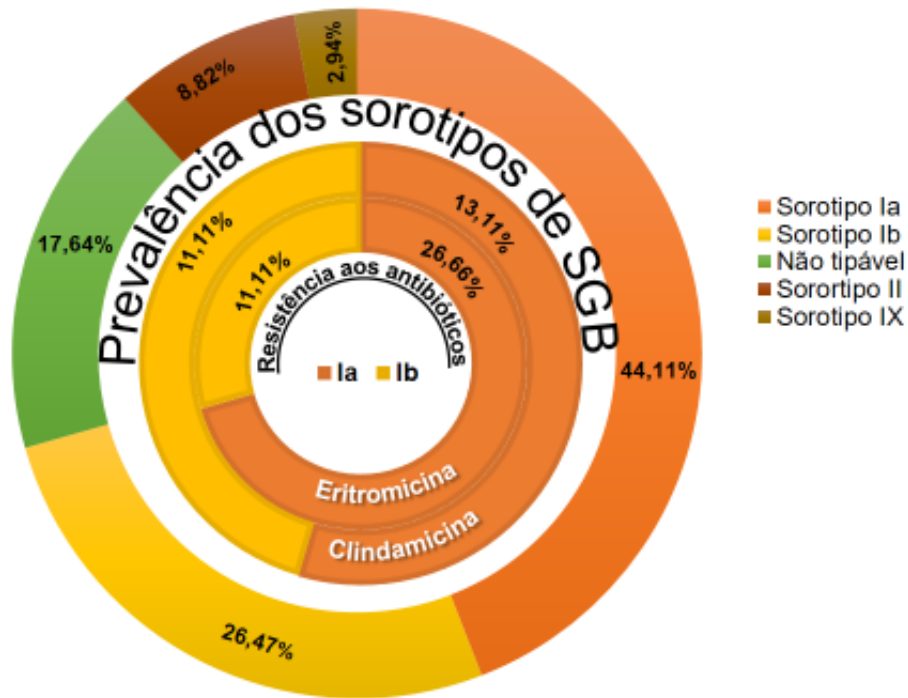


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 2% para os sorotipos de SGB. Colunas 1-8 (Amostras das gestantes). Coluna 9 (Controle negativo). Coluna 10: Marcador de peso molecular (100kb).



**Figura 8** - Prevalência de sorotipos de SGB e resistência aos antibióticos**Tabela 1.** Resistência antimicrobiana entre os sorotipos de SGB.

ID das Amostras	Eritromicina	Clindamicina	Fenótipo	Genes	Sorotipo
32	Resistente	Resistente	cMLSB	<i>mefA</i> , <i>ermB</i>	Ia
79	Intermediário	Resistente	cMLSB	<i>mefA</i>	Ia
98	Intermediário	Sensível	M	<i>mefA</i>	Ia
128	Resistente	Resistente	cMLSB	<i>ermB</i>	NT*
136	Resistente	Resistente	cMLSB	<i>ermTR</i>	**
174	Resistente	Sensível	M	<i>mefA</i>	Ia
177	Resistente	Resistente	cMLSB	<i>ermB</i>	NT*
209	Resistente	Resistente	cMLSB	<i>ermB</i>	Ib

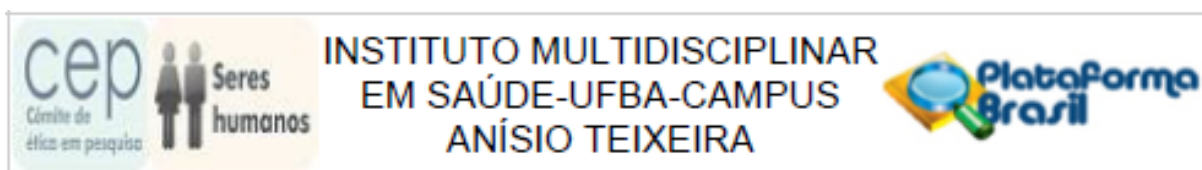
Fonte: Adaptada de Santana (2018)

\*Não tipável

\*\*Amostra não incluída na sorotipagem, pois foi inviabilizada em virtude de contaminação.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Streptococcus agalactiae: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista - BA.

**Pesquisador:** Márcio Vasconcelos Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58104118.8.0000.5556

**Instituição Proponente:** Instituto Multidisciplinar em Saúde-Campus Anísio Teixeira

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.738.058

**Apresentação do Projeto:**

O projeto de pesquisa "Streptococcus agalactiae: prevalência, perfil de sensibilidade, e comparação de métodos para identificação, em cepas isoladas de gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista – BA", foi proposto pelo Prof. da UFBA Márcio Vasconcelos Oliveira, também fazendo parte da equipe: Claudio Lima Souza, Fabrícia Almeida Fernandes Santana, Isabela Roseno Guimarães, Tais Andrade Vian e Thamilles de Sousa Silveira Dias. O objetivo geral do estudo consiste em "Estimar a prevalência de colonização e avaliar o perfil de sensibilidade de Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas no pré-natal de unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista, utilizando um estudo comparativo de metodologias para, isolamento e identificação do EGB". Trata-se de um estudo transversal quantitativo, a ser realizado em unidades básicas de saúde do município de Vitória da Conquista. A população a ser estudada será de (209) gestantes de 32 a 40 semanas em acompanhamento pré-natal, provenientes de 08 Unidades (urbanas) de saúde do município. A intervenção junto as pacientes consistirá (i) da leitura do TCLE (pelo médico ou enfermeira da unidade responsável pelo programa pré-natal), (ii) coleta da assinatura (do mesmo), (iii) aplicação de um questionário, e (iv) coleta da amostra biológica (único swab vaginal/retal; a ser realizada pelos profissionais responsáveis pelo atendimento no pré-natal durante as consultas). Estas

**Endereço:** RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58

**Bairro:** CANDEIAS

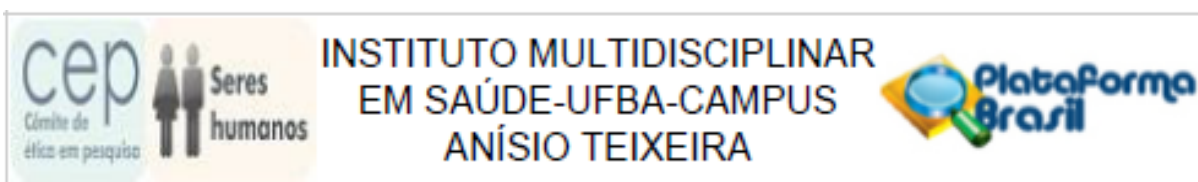
**CEP:** 45.029-094

**UF:** BA

**Município:** VITORIA DA CONQUISTA

**Telefone:** (77)3429-2720

**E-mail:** cepims@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.736.058

amostras serão encaminhadas para processamento no Laboratório de Análises Clínicas da UFBA (IMS/CAT). Como metodologia de processamento das amostras o estudo coloca que inicialmente os materiais de swab serão colocados para crescer; se houver crescimento, serão testados para identificação na amostra os estreptococos do grupo B (EGB), (teste CAMP, sorotipagem, caldo Granada e ágar cromogênico); e havendo identificação destes, serão realizados testes de sensibilidade a vários antibióticos (ampicilina, cefalotina, clindamicina, eritromicina, nitrofurantoína, penicilina). Será determinada o perfil genético de sensibilidade antimicrobiana a eritromicina através de PCR, seguida de eletroforese. Para o presente estudo, o banco de dados será construído em planilhas do pacote Microsoft Office Excel e as análises estatísticas: descritiva, univariada e multivariada serão realizadas com o auxílio do pacote estatístico EPI-INFO. O orçamento do projeto é de R\$ 62.163,39. Segundo cronograma de execução do projeto "preenchido na plataforma", a etapa de coleta e processamento das amostras serão iniciadas em 15/08/16; o que declaradamente está condicionado a aprovação pelo CEP.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

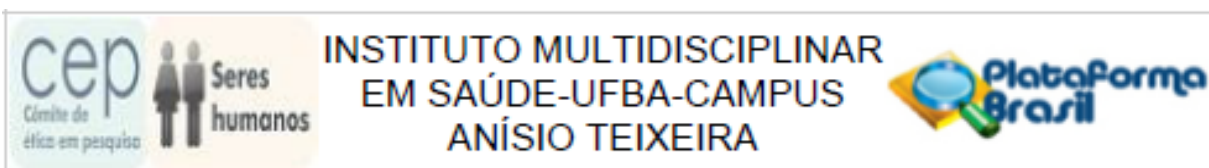
Segundo o autor, o objetivo geral (primário) do projeto consiste em "Estimar a prevalência de colonização e avaliar o perfil de sensibilidade de *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas no pré-natal de unidades básicas de saúde de Vitória da Conquista, utilizando um estudo comparativo de metodologias para, isolamento e identificação do EGB". Os objetivos específicos (ou secundários) do estudo, segundo o pesquisador são "1. Avaliar a ocorrência de colonização por *S. agalactiae* em gestantes com 32 a 40 semanas de gestação atendidas nas unidades básicas de saúde. 2. Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos das cepas isoladas em amostras coletadas das participantes do estudo. 3. Determinar os seus fenótipos de resistência dos *S. agalactiae* isolados no estudo. 4. Comparar as diferentes metodologias microbiológicas para identificação do *S. agalactiae*: crescimento em ágar cromógeno, teste de CAMP, caldo Granada e sorogrupagem, para os microrganismos isolados".

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como riscos, o projeto cita "O único risco que poderia existir seria a contaminação do trato genito-urinário das gestantes. Entretanto, para evitar que isso aconteça, primeiro será coletada a amostra vaginal e posteriormente retal".

Como benefícios, foi citado "O estudo realizará o diagnóstico de colonização, além do perfil de sensibilidade para o EGB nas gestantes, possibilitando o tratamento para aquelas que

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58  
 Bairro: CANDEIAS CEP: 45.029-094  
 UF: BA Município: VITORIA DA CONQUISTA  
 Telefone: (77)3429-2720 E-mail: cepims@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.736.058

apresentarem positividade e diminuindo os riscos de infecções nos neonatos. Os resultados serão importantes para a realização de um protocolo geral de atendimento das gestantes durante o pré-natal nas unidades básicas de saúde. Com o estudo, será escolhida a melhor forma de identificação do EGB levando em consideração de custo, benefício e qualidade diagnóstica, possibilitando o tratamento das gestantes baseado na antibioticoterapia utilizando o perfil de sensibilidade microbiana encontrada em cepas de EGB isoladas da população estudada. Dessa forma este estudo é uma estratégia de intervenção para a melhoria das condições de saúde neonatal no município de Vitória da Conquista e região, visto a grande demanda de gestantes atendidas. A quimioprofilaxia da gestante colonizada diminui o risco de contaminação do recém-nascido e, portanto, a morbimortalidade infantil.”

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os estreptococos do grupo B (EGB), ou *Streptococcus agalactiae*, são cocos Gram positivos que se caracterizam por ser a espécie que apresenta o antígeno do grupo B de Rebeca Lancefield. Possui grande relevância médica em relação à infecção de neonatos ocasionando quadros de septicemia, pneumonia e meningite. Segundo os autores, os dados a serem obtidos através do presente projeto possibilitarão o embasamento para definição de protocolo terapêutico para gestantes e, além disso, poderá apontar o método diagnóstico para identificação do EGB dentro das possibilidades ofertadas pelo sistema de saúde do município.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Quanto aos termos de consideração obrigatória, além de preencher o formulário online foram submetidos os seguintes arquivos: (i) Folha de controle interno (local) do CEP; (ii) Folha de rosto (impressa da própria Plataforma Brasil); (iii) Curriculum Lattes dos participantes da pesquisa; (iv) Declaração de participação no projeto dos participantes da pesquisa; (v) Autorização para Coleta de Dados; e (vi) O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Também foi anexado (a Plataforma Brasil) o Projeto (em separado). Neste, estava incluído questionário a ser aplicado.

#### **Recomendações:**

Todas as recomendações feitas em parecer anterior foram devidamente esclarecidas.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

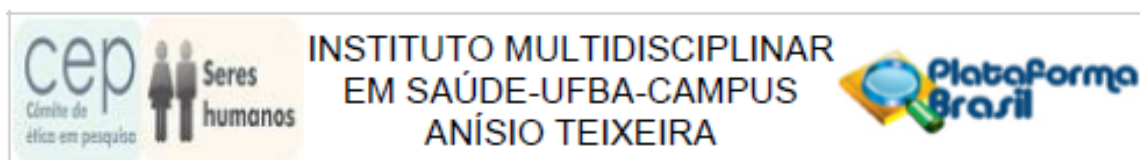
Não havendo pendências a serem sanadas indico a aprovação deste protocolo de pesquisa.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

O coordenador do CEP IMS/CAT avaliou e aprovou ad referendum este protocolo de pesquisa no

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58  
 Bairro: CANDEIAS CEP: 45.029-094  
 UF: BA Município: VITORIA DA CONQUISTA  
 Telefone: (77)3429-2720 E-mail: cepims@ufba.br





Continuação do Parecer: 1.736.058

dia 20 de setembro de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_729984.pdf	19/09/2016 19:36:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Atualizado.docx	19/09/2016 19:35:24	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Thamilles.pdf	25/07/2016 22:59:49	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Tais.pdf	25/07/2016 22:59:17	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Marcio.pdf	25/07/2016 22:58:50	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Isabela.pdf	25/07/2016 22:55:07	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Fabricia.pdf	25/07/2016 22:54:34	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Claudio.pdf	25/07/2016 22:54:02	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Folha_Local.pdf	04/07/2016 20:59:05	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pdf.pdf	04/07/2016 20:58:00	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/06/2016 17:34:18	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Outros	Parecer.pdf	01/06/2016 23:54:07	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	01/06/2016 23:51:06	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito

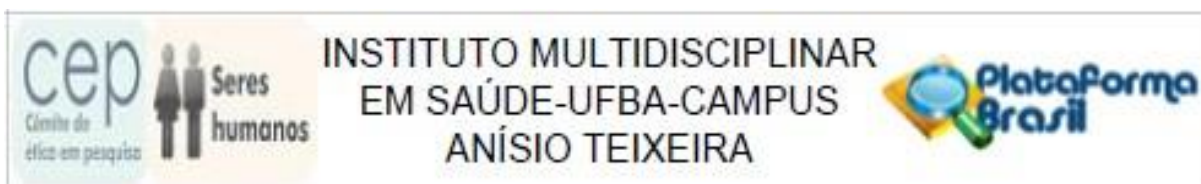
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58  
 Bairro: CANDEIAS CEP: 45.029-094  
 UF: BA Município: VITORIA DA CONQUISTA  
 Telefone: (77)3429-2720 E-mail: cepims@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.736.058

VITORIA DA CONQUISTA, 20 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Luciano Pereira Rosa**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58

**Bairro:** CANDEIAS

**CEP:** 45.029-094

**UF:** BA

**Município:** VITORIA DA CONQUISTA


**Telefone:** (77)3429-2720

**E-mail:** [ceplms@ufba.br](mailto:ceplms@ufba.br)

ANEXO 2

Clinical Microbiology [www.CHROMagar.com](http://www.CHROMagar.com)

# ● CHROMagar™ Orientation



**For isolation and differentiation  
of urinary tract pathogens**



# ● CHROMagar™ Orientation

www.CHROMagar.com



## Plate Reading



## Quality Control Strains

<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	→ turquoise blue
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	→ reddish
<i>S. aureus</i> ATCC® 12208	→ golden yellow
<i>S. pneumoniae</i> ATCC® 49619	→ colourless
<i>S. saprophyticus</i> ATCC® 15205	→ pink
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 10401	→ metallic blue

ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

## For isolation and differentiation of urinary tract pathogens

### Background

Urinalysis is the most common clinical microbial test. For instance, in France in 2007, out of 10 million microbiology tests carried out, 6 million (60%) were urinalyses. Thus, any workload reduction related to this analysis will dramatically improve the efficiency of the laboratory.

### Medium Performance

#### 1 INSTANT PALETTE OF COLOURS TO OBTAIN A LARGE SPECTRUM OF SPECIES DIFFERENTIATION

CHROMagar™ Orientation has several advantages over traditional media:

- allows in most cases full differentiation of the pathogens
- allows for reliable detection, enumeration and presumptive identification of urinary tract pathogens
- easier recognition of mixed growth
- provides higher detection rates

#### 2 HIGH DETECTION OF MINOR POPULATION

The proper use of CHROMagar™ Orientation will correctly pinpoint the presence of a minor population and will help to establish the right diagnosis and therapy.

#### 3 SAVE TIME AND REDUCE WORKLOAD

The most common UTI pathogen is *E. coli*, found in 40-70% of infections.

CHROMagar™ Orientation has a specificity of **99,3%\*** for *E. coli*, rendering the species confirmatory test largely unnecessary. One plate of CHROMagar™ Orientation will give the same information as the combination of the 3 classical plates used for UTI analysis (blood agar, CLED and MacConkey agar). Moreover, since it is easy to differentiate mixed flora on CHROMagar™ Orientation, antimicrobial susceptibility tests can be performed directly from primary isolates without the need of subcultures. \* Melon, F. et al. 1996. Evaluation of CHROMagar Orientation for Differentiation and Presumptive Identification of Gram-Negative Bacteria and Enterococcus Species. J.C.M. 34: 1788-1794.

#### 4 ISOLATION OF A VARIETY OF MICROORGANISMS

The major target of this medium is the detection of urinary tract pathogens but CHROMagar™ Orientation has a broader application as a general nutrient agar for the isolation of various microorganisms. CHROMagar™ Orientation can also be used to differentiate various microorganisms in other infected areas; e.g. scars. In addition, CHROMagar™ Orientation is useful when supplemented with various antibiotics in detecting increasingly important nosocomial and multidrug resistant microorganisms (See CHROMagar™ ESBL and CHROMagar™ KPC).

## Medium Description

Powder base	Total	31 g/L
Agar	15.0	
Peptone and yeast extract	17.0	
Chromogenic dyes	1.0	
Storage at 15/30°C - pH: 7.0 ± 0.2		
Shelf Life	2 years	

Usual Samples	urine
Procedure	Direct streaking. Incubation at 37°C, 18-24h, Aerobic condition.

Scientific Publications on this product: available on [www.CHROMagar.com](http://www.CHROMagar.com)  
Please read carefully the instructions for use (IFU document) available on [www.CHROMagar.com](http://www.CHROMagar.com)

## Order References

Please use these product references when contacting your local distributor:

1000 ml pack	..... RT410
5000 ml pack	..... RT412
25 L pack	..... RT413-25
Bulk	..... on request

Manufacture: CHROMagar  
4 place du 18 juin 1940 75006 Paris - France  
Email: [CHROMagar@CHROMagar.com](mailto:CHROMagar@CHROMagar.com)  
Website: [www.CHROMagar.com](http://www.CHROMagar.com)  
Find your nearest distributor on  
[www.CHROMagar.com/contact](http://www.CHROMagar.com/contact)

## ANEXO 3

## BIOMÉRIEUX

REF 42 116

12041 E - pBR - 2006/08



## Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)

IVD

Caldo de enriquecimento seletivo para os estreptococos do grupo B.

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO DO TESTE

O caldo Todd-Hewitt + Antibióticos é um caldo de enriquecimento seletivo destinado à detecção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida (1, 2, 3, 4).

Este caldo pode também ser utilizado para o enriquecimento dos *S. aureus* no âmbito do rastreio dos *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA).

## PRINCÍPIO

A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora polimicrobiana.

Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos da flora de acompanhamento.

Após a etapa de enriquecimento, o caldo Todd-Hewitt + Antibióticos deve ser replicado em meios destinados à detecção dos estreptococos (4).

## APRESENTAÇÃO

REF 42 116	Melo pronto para usar Embalagem de 20 tubos de 9 ml
------------	--

## COMPOSIÇÃO

## Fórmula teórica

Este meio pode ser ajustado e/ou suplementado em função dos critérios de qualidade impostos:

Peptona de caseína (bovina).....	11 g
Peptona de soja.....	2 g
Peptona de coração (bovino ou porcino).....	9 g
Hidrogenofosfato dissódico.....	0,5 g
Carbonato de sódio.....	0,2 g
Glicose anidra.....	2 g
Cloreto de sódio.....	2 g
Ácido nalidíxico.....	0,015 g
Colistina.....	0,010 g
Água destilada.....	11
pH 7,8	

## REAGENTE E MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

## Reagentes:

- Gelose Columbia + 5% de sangue de camelo (Ref. 43 041 ou 43 049)
- Gelose chromID™ Strepto B (Ref. 43 451)
- Gelose GRANADA (Ref. 43 712)
- Gelose chromID™ MRSA (Ref. 43 451 ou 43 459)

## Material:

- Estufa de bacteriologia.

## PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Unicamente para uso profissional.
- Este dispositivo contém componentes de origem animal. O controle da origem e/ou o estado sanitário dos animais não pode garantir de forma absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível, é aconselhado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos (não ingerir, nem inalar).

- As amostras, culturas bacterianas e produtos inoculados devem ser considerados como potencialmente infecciosos e devem ser manipulados de forma apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Revisão em vigor". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety In Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Última edição", ou a regulamentação em vigor no país de utilização.

- Os meios de cultura não devem ser utilizados como materiais ou componentes de fabrico.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade.
- Não utilizar tubos suspeitos de contaminação.
- Antes da utilização, assegurar-se que a cápsula não está danificada.
- Um pequeno precipitado no fundo dos tubos não altera o comportamento funcional do produto.
- Os elementos microscópicos podem provir de microrganismos mortos que podem ser observados no caldo, sem degradação do comportamento funcional do meio.
- O comportamento funcional apresentado foi obtido com o procedimento indicado neste folheto informativo. Qualquer desvio de procedimento pode alterar os resultados.

## CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os tubos conservam-se entre 2° C e 8° C na embalagem até a data de validade.

## AMOSTRAS

- Pesquisa de Estreptococos do grupo B

O caldo é inoculado diretamente a partir de coletas de origem anal ou vaginal.

É necessário respeitar as boas práticas em termos de coletas e de transporte, adaptadas a cada tipo de amostra (4).

- Pesquisa de MRSA

Consultar o folheto informativo chromID™ MRSA.

## PROCEDIMENTO

- Pesquisa de Estreptococos do grupo B

1. Deixar os tubos atingir a temperatura ambiente.
2. Inocular a coleta e em seguida homogeneizar o caldo.  
Nota: O caldo inoculado pode ser conservado entre 18°C e 25°C durante 3 horas antes da incubação.
3. Incubar na estufa a 37° C durante 18 a 24 horas. A escolha da temperatura de incubação é da responsabilidade do usuário em função da aplicação e das normas em vigor (2).
4. Efetuar uma replicagem num meio de isolamento destinado à detecção dos estreptococos (por exemplo: ChromID™ Strepto B ou gelose GRANADA, etc).
5. Incubar o meio de isolamento em conformidade com as recomendações indicadas no folheto informativo correspondente.



**- Pesquisa de MRSA**

Consultar o folheto Informativo do chromID™ MRSA.

**LEITURA E INTERPRETAÇÃO**

- Consultar o folheto informativo do meio de isolamento utilizado.

**CONTROLE DE QUALIDADE**

Protocolo:

A fertilidade e a seletividade do meio pode ser testada a partir das cepas seguintes:

- *Streptococcus agalactiae* NCTC 8190.
- *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Resultados esperados:

Cepa	Resultados a 33°- 37°C
<i>Streptococcus agalactiae</i> NCTC 8190	Crescimento após 18 horas
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Inibição após 24 horas

Nota:

É da responsabilidade do usuário ter em conta a natureza da aplicação e a legislação local em vigor para a elaboração do controle de qualidade (frequência, número de estirpes/cepas, temperatura de incubação, etc).

**LIMITES DO TESTE**

- O desenvolvimento depende das exigências específicas de cada microrganismo. É portanto possível que algumas cepas tendo exigências específicas (substrato, temperatura, atmosfera de incubação, etc) não se desenvolvam.
- Podem-se desenvolver algumas cepas Gram (-) resistentes aos antibióticos contidos no meio.

**COMPORTAMENTO FUNCIONAL****- Pesquisa de Estreptococos do grupo B**

O comportamento funcional foi avaliado, a 37°C, a partir de 423 amostras hospitalares coletadas em mulheres grávidas e testadas por comparação segundo os 2 métodos seguintes.

	Caldo de enriquecimento	Meio de Isolamento
Método 1	Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos	Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
Método 2	Caldo Schaedler	Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro

A presença de estreptococos do grupo B (amostra positiva), foi detectada em 71 amostras com os 2 métodos. O método 1 permitiu detectar uma amostra positiva suplementar.

Consultar também os folhetos Informativos do ChromID™ Strepto B e gelose GRANADA.

**- Pesquisa de MRSA**

Consultar o folheto informativo chromID™ MRSA.

**ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS**

Elimine todos os reagentes, assim como os materiais de utilização única, contaminados seguindo os procedimentos relativos aos produtos infectantes.

Os reagentes não utilizados podem ser eliminados como resíduos não perigosos.

Restos de amostras, reagentes e controles, considerados como resíduos do Grupo A1 devem ser coletados em um recipiente para este propósito e colocados em autoclave por 1 hora a 121°C (soluções que contenham lixívia não podem ser colocadas na autoclave).

As embalagens secundárias não contaminadas pelo produto devem ser fisicamente descaracterizadas e acondicionadas como Resíduo do Grupo D, podendo ser encaminhadas para processo de reciclagem. As embalagens e materiais contaminados devem ser tratados da mesma forma que a substância que as contaminou.

É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes que este produz consoante a sua natureza e o seu perigo, e assegurar (ou fazer assegurar) o tratamento e a eliminação em conformidade com as regulamentações aplicáveis.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**










1. BAKER C.J, CLARK D.J, BARRETT F.F. - Selective broth medium for isolation of group B streptococci. - Appl. Microbiol., 1973, vol. 26, n° 8, p. 884-885.
2. COURTIOL S., CASETTA A., BOUSSOUYANT Y. - Infections à streptococques du groupe B (SGB) - Feuilles de Biologie, 1998, vol. 34, n° 225.
3. TRANCHAND S. - Les infections à *Streptococcus agalactiae*. - Le lettre de l'infectiologue, 1992, vol. 7, n° 7.
4. Centers for Disease Control and prevention - Morbidity and mortality weekly report. Prevention of perinatal group B Streptococcal Disease. - August 18, 2002, Vol. 51, n° RR-11.
5. Roux C. Hôpital de la Croix - Rousse - Lyon, France - Prevention of perinatal Group B streptococcal infections : Evaluation of a new chromogenic medium Strepto B ID.

**GARANTIA LIMITADA**

A bioMérieux garante o desempenho do produto para o uso ao qual se destina desde que todos os procedimentos de uso, armazenamento e manuseio, a validade (quando aplicável) e as precauções sejam cumpridos estritamente conforme detalhado nas Instruções de uso (IDU).

Exceção conforme expressamente previsto acima, a bioMérieux isenta-se de quaisquer garantias, incluindo qualquer garantia implícita quanto ao caráter comercial e à adequação a um propósito ou uso específico, e isenta-se de qualquer responsabilidade, direta, indireta ou consequente, por qualquer uso do reagente, software, instrumento e descartáveis (o "Sistema") que não é estabelecido nas instruções de uso.

**QUADRO DE SÍMBOLOS**

Símbolo	Significado
	Referência de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Limites de temperatura
	Prazo de validade
	Código do lote
	Consulte as instruções de utilização
	Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	Data de fabricação

**HISTÓRICO DAS REVISÕES****Categorias do tipo de modificação:**

N/A	Não aplicável (Primeira publicação)
Correção	Correção de irregularidades na documentação
Alteração técnica	Adição, revisão e/ou remoção de informações relativas ao produto
Administrativas	Implementação de alterações não técnicas perceptíveis para o usuário
<b>Nota:</b>	<b>As modificações menores de tipografia, gramática e configuração de página não aparecem no histórico de revisões.</b>

Data da versão	Referência do documento	Tipo de modificação	Resumo da modificação
2009/08	12041E	Administrativa	2016/05 : Criação da bula 12041E para integrar os textos de acordo com a RDC 36/2015 – ANVISA.

Distribuído por bioMérieux Brasil Indústria e Comércio de Produtos Laboratoriais Ltda. -  
 Est. Mapak 401- Lote 1 – Taquara-Jacarepaguá – Rio de Janeiro - RJ. CEP: 22.713-320  
 CNPJ: 33.040.635/0001-71


Atendimento ao consumidor : 0800-026-4848

Prazo de Validade, Nº de Lote, Nº de Registro no Ministério da Saúde e Responsável Técnico:  
 VIDE EMBALAGEM

BIOMERIEUX, o logótipo BIOMERIEUX, CHROMID são marcas comerciais usadas, pendentes e/ou registradas da bioMérieux ou de uma de suas subsidiárias, ou de uma de suas empresas.

A marca ATCC, o nome comercial e quaisquer números do catálogo ATCC são marcas registradas da American Type Culture Collection.

As outras marcas e produtos mencionados são de propriedade dos respectivos proprietários.

 **bioMérieux SA**  
 376 Chemin de l'Orme  
 69280 Marcy-l'Étoile - France

673 620 399 RGS LYON  
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
 www.biomerieux.com

